

Charakterisierung Doublecortin – positiver Zellen in der Umgebung fokaler Infarkte

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich – Schiller – Universität Jena**

von Alexandra Achilles

geboren am 31.05.1986 in Zwickau

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. med. Christoph Redecker - Klinikum Lippe GmbH**
- 2. Prof. Dr. med. Sebastian Jander - Universitätsklinikum Düsseldorf**
- 3. Prof. Dr. med. Michael Schroeter - Universitätsklinikum Köln**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.09.2018

Abkürzungsverzeichnis

BrdU	5-Bromo-2-desoxyuridin, Proliferationsmarker
CC – Region	Corpus Callosum – Region
CTRL	Kontrolle
DAB	3,3' – Diaminobenzidin
DCL	Doublecortin – Like, embryonaler Expressionsmarker glia – ähnlicher Zellen
DCX	Doublecortin, Migrationsmarker neuronaler Vorläuferzellen
GFAP	glial fibrillary acidic protein
MIP	Maximum Intensity Projection
MWU – Test	Mann – Whitney – U – Test
RMS	Rostraler Migrationsstrom
SVZ	Subventrikularzone
TBS	Trisgepufferte Salzlösung

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	5
2. Einleitung	7
3. Zielsetzung	12
4. Material und Methoden	13
4.1 Induktionen kortikaler Infarkte	13
4.2. Experimentelles Design	14
4.3. Gewebepräparation.....	15
4.4. Immunhistochemie	15
4.5. Immunfluoreszenz.....	16
4.6. Quantifizierung und konfokale Lasermikroskopie	17
4.7. Statistik	18
5. Ergebnisse.....	20
5.1. Morphologie der photothrombotischen Infarkte	20
5.2. Identifizierung zweier DCX ⁺ -Zellpopulationen in der Infarktumgebung	20
5.3. Quantifizierung der DCX ⁺ – Zellen	22
5.4. Proliferationsfähigkeit der beiden DCX ⁺ – Zellpopulationen.....	25
5.5. Phänotypisierung der DCX ⁺ – Sternzellen	27
6. Diskussion	33
7. Schlussfolgerung	38
8. Literatur – und Quellenverzeichnis	40
9. Anhang	46
9.1. Danksagung.....	46
9.2. Förderung	46
9.3. Ehrenwörtliche Erklärung	47

1. Zusammenfassung

Das Gehirn besitzt lebenslang einen höchsten Grad an Plastizität. Sehr genau ist die synaptische (funktionelle) Plastizität untersucht, bei der eine Regulation auf Ebene der neuronalen Synapsen erfolgt. Neuere Arbeiten zeigen, dass auch sehr umschrieben die Neubildung von Nervenzellen stattfindet (strukturelle Plastizität). Der Gyrus dentatus des Hippocampus sowie die Subventrikularzone (SVZ) im Bereich des Seitenventrikels liefern die hierfür benötigten Stammzellen. Diese Stammzellen reifen im Physiologischen durch Stimuli zu sogenannten Progenitorzellen (Vorläuferzellen) und im weiteren Verlauf zu Neuronen heran. Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass es nach Hirnläsionen auch außerhalb der neurogenen Regionen im Bereich der Hirnrinde zur Nervenzellneubildung kommen könnte. Nach einem Schlaganfall lassen sich in der Infarktumgebung mit klassischen Markierungstechniken und morphologischen Untersuchungen vorrangig Gliazellen nachweisen. Neuere immunhistochemische Studien zeigten jedoch, dass Zellen in einem signifikanten Ausmaß hier auch Marker von unreifen Nervenzellen exprimieren. Dabei kam dem Nachweis von Doublecortin (DCX) eine besondere Bedeutung zu. DCX ist ein mikrotubulär – assoziiertes Protein, welches von migrationsfähigen Neuronen während der Zellwanderung exprimiert wird. Es ist ein verlässlicher neuronaler Marker im Hippocampus und der SVZ. Der Nachweis von DCX in der Infarktumgebung legte die Vermutung nahe, dass hier postischämisch eine kortikale Neurogenese stattfindet. Insgesamt sind die DCX – positiven Zellen in der Infarktumgebung jedoch sehr unzureichend untersucht und es ergibt sich die Frage, ob es sich dabei wirklich um unreife Nervenzellen handelt.

Ziel der aktuellen Studie war eine detaillierte Charakterisierung der DCX⁺ – Zellen in der Infarktumgebung hinsichtlich ihrer Morphologie, ihrer perifokalen Verteilung sowie ihrer genaueren Phänotypisierung und einer möglichen Entdifferenzierung zu Neuronen.

Hierzu wurde ein Tiermodell eingesetzt, bei dem über eine Photothrombose ein fokaler Hirninfarkt bei Mäusen ausgelöst wurde. Aufgrund der sehr umschriebenen Ausdehnung des Infarktes sind Untersuchungen in der Randzone der Läsion sehr gut möglich. Zur Markierung erfolgte die peritoneale Injektion eines Proliferationsmarkers 5-Bromo-2-Desoxyuridin (BrdU). An vier Beobachtungszeitpunkten erfolgte für die Aufarbeitung der Gehirne die transkardiale

Perfusion. Das perifokale Hirngewebe wurde für die folgenden Analysen in die Kortex – und die Corpus Callosum (CC) – Region unterteilt. Nach immunhistochemischen Färbungen konnten in diesen beiden Regionen anschließend zwei unterschiedliche Zelltypen detektiert werden: einerseits Zellen mit zahlreichen radiären, vom Zellkörper wegführenden Fortsätzen (Sternzellen) und andererseits Zellen mit ein oder zwei Fortsätzen (Polarzellen). Sowohl die Stern- als auch die Polarzellen wiesen in der Immunfluoreszenz die Expression von DCX auf. Die Sternzellen konnten sowohl in der Kortexregion als auch in der CC – Region beobachtet werden. Indessen traten die Polarzellen hauptsächlich in der CC – Region auf. Im Vergleich zur kontralateralen (gesunden) Seite wiesen beide Zellsubpopulationen einen signifikanten Anstieg ihrer Zellanzahl im Verlauf des Beobachtungszeitraumes von 28 Tagen in der untersuchten Infarktumgebung auf. Interessanterweise zeigten ausschließlich die Sternzellen ein signifikantes Ergebnis hinsichtlich ihrer Proliferationsfähigkeit. Sowohl in der Kortexregion als auch in der CC – Region sind 50% (Kortex) bzw. 60% (CC – Region) der Sternzellen postischämisch entstanden. Bemerkenswerterweise proliferierten die Polarzellen sowohl im Corpus Callosum der pathologischen als auch auf der gesunden Seite, womit sich im Vergleich keine Signifikanz ergab. Die Phänotypisierung mittels verschiedenen immunhistochemischen Markern und konfokaler Mikroskopie ergab, dass die DCX⁺ – Sternzellen glialer Herkunft sind. Die DCX⁺ – Polarzellen exprimierten weder Marker von Nervenzellen noch von Gliazellen, so dass es sich dabei wahrscheinlich um Vorläuferzellen handelt. Die vornehmliche Detektion der DCX⁺ – Polarzellen im Bereich des Balkens stützt diese Annahme und legt eine Migration aus der SVZ nahe.

Zusammenfassend weisen unsere Studienergebnisse nach, dass in der Umgebung eines fokalen Infarktes zwei DCX⁺ – Subpopulationen vorkommen. Die Mehrzahl der DCX⁺ – Zellen weist eine sternförmige Morphologie auf und zeigt einen glialen Phänotyp. Dem gegenüber stehen DCX⁺ – Polarzellen, welche nach ihrem Aussehen wahrscheinlich migrierenden Zellen entsprechen. Eine genauere Phänotypisierung der DCX⁺ – Polarzellen war nicht möglich. Eine Expression von neuronalen Markern war auch bei diesem DCX⁺ – Zelltyp nicht nachweisbar. Insgesamt ergibt sich aus unserer Studie kein Hinweis, dass eine Nervenzellneubildung in der Infarktumgebung stattfindet.

2. Einleitung

Nach Aussage des Statistischen Bundesamtes sind 2014 ca. 16.753 Menschen in Deutschland am Schlaganfall verstorben. Damit zählt der Apoplex aktuell zu den zehn häufigsten Todesursachen in Deutschland. Innerhalb von zehn Jahren, von 2004 bis 2014, konnte die Anzahl der Todesfälle bedingt durch einen Schlaganfall mithilfe verbesserter Erkennung, schnellerem Transport in die Kliniken und optimierten Behandlungsstrategien fast halbiert werden. Nahm der Schlaganfall 2004 noch den 5. Platz der häufigsten Todesursachen in Deutschland ein, war es im Jahre 2014 nur noch der 10. Platz (Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn, Stand 15.12.2015). Neben der Erkennung und schnellen Versorgung der Patienten liegt weiterhin der Schwerpunkt auf der Behandlung häufig resultierender motorischer, sensibler und sprachlicher Defizite. Zahlreiche Studien verfolgen daher seit jeher das Ziel, die durch Ischämie (80 – 85 %) oder Blutung hervorgerufenen Gehirnsubstanzdefekte mithilfe von Training, Medikamenten und sogar Stammzelltransplantation mesenchymaler Zellen (Hosseini et al. 2015) zu kompensieren und wieder neu aufzubauen. Forschungsschwerpunkte sind dabei die Hirnregionen, in denen auch im erwachsenen zentralen Nervensystem kontinuierlich neue Nervenzellen gebildet werden. Diese adulte Neurogenese ist auf zwei Regionen begrenzt, der Subgranulärzone des Hippocampus und der Subventrikulärzone (SVZ) der Seitenventrikel (Cayre et al. 2009) (**Abb. 1**).

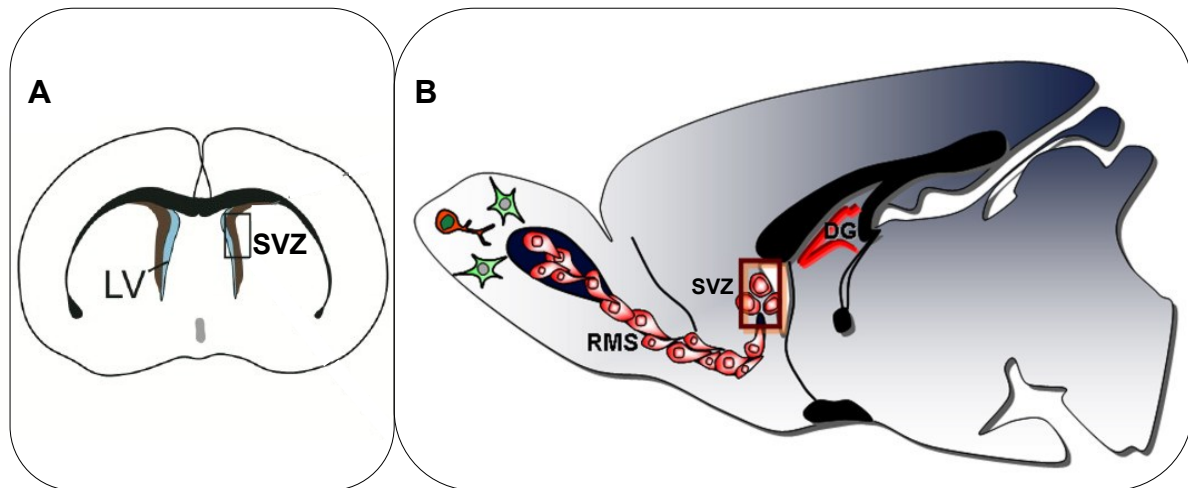


Abbildung 1: A) Koronaler Anschnitt eines Maushirns auf Höhe der Seitenventrikel (LV) und der angrenzenden Subventrikularzone (SVZ). B) Sagittalschnitt eines Maushirns mit Darstellung des von der SVZ zum Bulbus olfactorius ziehenden rostralen Migrationsstromes (RMS). DG – Gyrus dentatus des Hippocampus. Modifiziert nach: (Cayre et al. 2009).

Schon seit Langem ist bekannt, dass das Gehirn sehr plastisch ist, ständig neue Verbindungen knüpft (axonales Remodelling) sowie Fortsätze und Synapsen gebildet werden (Synaptogenese). Entgegen einem langen Dogma, dass keine Nervenzellneubildung stattfindet, haben neuere Erkenntnisse ergeben, dass zeitlebens in umschriebenen Hirnregionen eine Neurogenese abläuft und zwar im Hippocampus und der Subventrikularzone. Diese beiden Regionen behalten zeitlebens ihre Fähigkeit Neurone proliferieren und reifen zu lassen, indem sie permanent ein entsprechendes Milieu aufrechterhalten. Neben physiologischen Prozessen, wie Lernen und Trainingsprozessen (Kempermann et al. 1997) regen auch Hirnläsionen, zerebrale Ischämien (Jin et al. 2001, Sharp et al. 2002) oder Epilepsie (Parent et al. 1997, Jessberger et al. 2007) die Neurogenese vor allem in der Subgranulärzone des Hippocampus an. Eine pharmakologische, positive Beeinflussung der Neurogenese konnte zunehmend nachgewiesen werden. Andere körpereigene Substanzen, wie zum Beispiel Neurotrophine wie NGF („**n**erv **g**rowth **f**actor“), BDNF („**b**rain **d**erived **n**eurotrophic **g**rowth **f**actor“), und FGF („**f**ibroblast **g**rowth **f**actor“), aber auch Hormone und Neurotransmitter wirken modulierend. Neuere Studien haben ihren Schwerpunkt unter anderem auf G-CSF (**g**ranulocyte **c**olony – **s**timulating **f**actor) gelegt (Song et al. 2016). Diese Studien nehmen vor

allem Bezug auf die Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippocampus. Doetsch et al. hingegen untersuchte 1997 den dreidimensionalen Zellaufbau der Subventrikularzone der Seitenventrikel, um weitere Erkenntnisse über die Zellen, welche über den rostralen Migrationsstrom zum Bulbus olfactorius wandern und dort zu Neuronen differenzieren, zu erlangen (Doetsch et al. 1997). Es konnten fünf Zellarten isoliert und weiter charakterisiert werden. Typ A – Zellen mit einem oder zwei vom Zellkörper wegführenden Fortsätzen, welche aufgrund ihrer PSA-NCAM – Expression als proliferierende und im rostralen Migrationsstrom migrierende Vorläuferzellen oder Neuroblasten definiert wurden. Typ B (B1 und B2) – Zellen, welche Astrozyten (GFAP^+ / Vimentin^+) oder reaktiven Astrozyten (Nestin^+) entsprachen. Aus manchen Typ B – Zellen gehen wiederum Typ C – Zellen hervor, welche als Vorläuferzelle der Neuroblasten (Typ A) zählen. Alle drei Zelltypen standen durch Fortsätze miteinander in Kontakt. Typ D – Zellen und Typ E – Zellen entsprechen Ependymzellen. Die Subventrikularzone ist somit immunhistochemisch eine Region, in der neuronale Vorläuferzellen bereitgestellt werden, welche dann einem ausgeklügelten System von Signalkaskaden folgend abwandern und sich am Ort ihrer Bestimmung entdifferenzieren (Alonso et al. 2008).

In den letzten 20 Jahren rückten die Astrozyten immer mehr in den Vordergrund. Diese Hirnzellen gehören zu den Gliazellen, welche klassisch als Klebesubstanz und einfache Gerüstzelle („glue“) betrachtet wurden und keine besonderen Funktionen zugesprochen bekamen. Aktuelle Ergebnisse zeigten jedoch, dass neben Stützfunktion und der Beteiligung an der Blut – Hirn – Schranke auch die Ernährung der Neurone über Kontakte zu Blutgefäßen zu dem Aufgabengebiet der Astrozyten im Gesunden gehört (Montgomery 1994). Weiterhin tragen sie zur synaptischen Plastizität bei, indem sie durch die Ausbildung von Fortsätzen die Ausbildung von Synapsen steuern und über Mediatorenfreisetzung direkt die synaptische Übertragung modifizieren. Zusätzlich regulieren Astrozyten die extrazelluläre Kaliumkonzentration (K^+ – Pufferung/Clearance). Unter pathologischen Bedingungen galten sie anfänglich lediglich als Barriere vor einsetzenden Abbauprozessen des erkrankten Gewebes gegenüber dem gesunden Hirngewebe. Spätere Arbeiten zeigten, dass sie die axonale Regeneration von Nervenzellen unterstützen (Ridet et al. 1997, Bush et al. 1999). Schließlich sprach Kernie et al. 2001 von aktivierten Astrozyten, welche in umschriebenen Hirnregionen zur Neurogenese fähig sein könnten (Kernie et al. 2001).

Ungefähr zeitgleich haben Studien den Ansatz verfolgt, dass neben der Subgranulärzone des Hippocampus und der SVZ der Seitenventrikel der Kortex unter entsprechenden adäquaten Reizen und Konditionen zur Regeneration fähig sein kann (Magavi et al. 2000, Keiner et al. 2009, Sirko et al. 2009, Ohira et al. 2010). Eine besondere Rolle kam hier dem Protein Doublecortin (DCX) zu, welches nach immunhistochemischen Studien charakteristischerweise von unreifen Nervenzellen in den neurogenen Regionen (Hippocampus und SVZ) exprimiert wird. Die Detektion von DCX auch im Kortex in der Umgebung von Läsionen legte somit die Vermutung nahe, dass auch hier eine umschriebene Nervenzellneubildung stattfinden könnte. In verschiedenen Studien wurde DCX als ein mikrotubulär – assoziiertes Protein identifiziert, welches von migrationsfähigen Neuroblasten während der Zellmigration Richtung Gehirnoberfläche und nur innerhalb einer limitierten Wachstumsphase exprimiert wird und zwar sowohl in sich entwickelnden als auch in adulten Säugetieren (Francis et al. 1999, Gleeson et al. 1999, Matsuo et al. 1998). DCX spielt also eine entscheidende Rolle bei der neuronalen Migration, in dem es in die phosphorylierungsabhängige Stabilisierung der Mikrotubuli (Gleeson et al. 1999, Weimer und Anton 2006), die Kerntranslokation (Koizumi et al. 2006) und die Dynamik der Wachstumskegel involviert ist (Koizumi et al. 2006, Burgess und Reiner 2000, Friocourt et al. 2003). DCX ist demnach bewiesenermaßen für die neuronale Migration während der Gehirnentwicklung entscheidend.

Mutationen in der Expression von Doublecortin führen zu ausgeprägten Migrationsdefekten im Menschen und sind bei Frauen ursächlich für die subkortikale Bandheterotopie (SBH, „Doppeltes Rinden“ – Syndrom). Bei Männern führt eine solche Mutation zur wesentlich ernsteren Lissenzephalie („smooth brain“ – Syndrom) (Kerjan und Gleeson 2007, Manent et al. 2009). Im erwachsenen Gehirn wird DCX innerhalb der Neurogenesezonen, Gyrus dentatus und SVZ, weiterhin von unreifen Neuronen exprimiert. Geht man davon aus, dass verschiedene Regionen des Neokortex über den entorhinalen Kortex und weiter über den Tractus perforans zum Gyrus dentatus direkt mit dem bisher gut erforschten Hippocampus verschaltet sind (Witter et al. 1989), überrascht das Ergebnis einer Studie nicht, dass die DCX – Expression im Gyrus dentatus mit einer Zunahme der adulten Neurogenese korreliert (Couillard-Despres et al. 2005) und die DCX⁺ – Neurone für erfolgreiches räumliches Lernen erforderlich sind (Vukovic et al. 2013). Aus diesen Gründen wird DCX auch

weitverbreitet als Marker für neuronale Vorläuferzellen und für die Neurogenese verwendet.

Im ausgereiften, erwachsenen Gehirn ist die Expression von Doublecortin außerhalb der neurogenen Areale in der Hippocampusformation und der subventrikulären Zone eher selten. Brown et al. fand lediglich eine DCX⁺ – Zelle in jedem 20 – 25 Schnitt in normalen, adulten Neokortexen von Ratten (Brown et al. 2003). Unter pathophysiologischen Bedingungen, wie zum Beispiel bei Epilepsie, ändert sich das Expressionsmuster von Doublecortin und es konnten DCX⁺ – Zellen in deutlich kortikalen Arealen beobachtet werden (Liu et al. 2008). Zusätzlich wurden DCX⁺ – Zellen nach fokalen ischämischen Schlaganfällen innerhalb des Striatums und der periläsionalen Rinde außerhalb der umschriebenen neurogenen Regionen detektiert (Arvidsson et al. 2002, Jin et al. 2003, Keiner et al. 2009).

In einer kürzlich durchgeführten Studie zeigten wir, dass ein großer Teil der BrdU⁺ – Zellen in der kortikalen periläsionalen Zone zwei Wochen nach einem fokalen Infarkt Doublecortin exprimierten (Keiner et al. 2009). Offensichtlich führten diese Zellen nicht zu Neuronen, da zum Beispiel sechs Wochen nach der Ischämie keine BrdU⁺/NeuN⁺ – Zellen beobachtet werden konnten. Hervorzuheben ist dennoch, dass eine genetische Ablation von DCX vor Setzung eines pathologischen Reizes zu einem schlechteren Outcome nach Schlaganfall führt, sowohl kurzzeitig als auch längerfristig (Jin et al. 2010, Sun et al. 2012).

Trotz dieser umfassenden Untersuchungen bleibt offen, welche Zellen in der periläsionalen Zone DCX exprimieren. Einige Studien weisen auf eine Neuroblastenmigration ausgehend von der Subventrikularzone und dem rostralen Migrationsstrom in Richtung des Infarktes hin (Jin et al. 2003, Arvidsson et al. 2002, Ohab et al. 2006). Das Ausmaß und die Verteilung der DCX⁺ – Zellen in der Infarktumgebung lassen jedoch immer noch keinen Rückschluss zu, ob diese Zellen von der neurogenesefähigen Region Subventrikularzone in Richtung Läsion abwandern. Es scheint eher wahrscheinlich, dass lokal residierende Zellen (zum Beispiel neuronale oder gliale Zellen) durch den pathologischen Reiz der Ischämie zur DCX – Expression stimuliert werden. Aus diesem Grund haben wir die in der perifokalen Umgebung befindlichen DCX⁺ – Zellen über einen Zeitraum von vier Wochen ohne weitere Stimuli, wie reizreiche Umgebung, motorisches Training oder förderliche Medikamente erforscht.

3. Zielsetzung

Die vorliegende Studie hat folgende Fragestellungen analysiert:

1. Welche Morphologie weisen DCX⁺ – Zellen in der Umgebung von fokalen Hirninfarkten auf?
2. Wie sind diese DCX⁺ – Zellen in den periläsionalen Infarktzone verteilt und welches Proliferationsverhalten weisen sie innerhalb der beobachteten Zeiträume auf?
3. Welche weiteren Marker exprimieren DCX⁺ – Zellen und was sagt dies über ihren Phänotyp aus?

Mithilfe des ausgewählten Studiendesigns ist uns eine Aussage bezüglich der Morphologie, Verteilung und Phänotypisierung von DCX⁺ – Zellen in der Infarktumgebung möglich.

4. Material und Methoden

Die Durchführung der Studie erfolgte an 28 adulten, männlichen C57BL/6J Mäusen, welche zum Beginn des Experimentes zwischen 11 und 15 Wochen alt waren und zwischen 20 und 30 g wogen. Die Studie erfolgte in Kongruenz mit den EU-Richtlinien zum Schutz von Versuchstieren und mit Genehmigung des deutschen Ethikkomitees. Fünf bis sechs Tiere lebten in standardisierten Käfigen mit frei zugänglicher Nahrungs- und Wasserversorgung nach einem 12 h Licht / 12 h Dunkelheit Rhythmus.

4.1 Induktionen kortikaler Infarkte

Alle Tiere erhielten einen nicht-invasiv induzierten photothrombotischen Infarkt im rechten sensomotorischen Vorderpfotenkortex. Durch Injektion des photosensiblen Farbstoffes Bengalrosa und anschließender Bestrahlung einer definierten zerebralen Region des intakten Schädels mit einer Kaltlichtquelle kommt es lokal zur Bildung von freien Radikalen, welche zu einer peroxidativen Schädigung der endothelialen Membran des Gefäßes und damit zur gewünschten Thrombose führen. Hierdurch entstehen in Größe und Lokalisation gut reproduzierbare Ischämien. Erstmals wurde diese Methode von Watson (Watson et al. 1985) an Ratten beschrieben, später durch Schroeter (Schroeter et al. 2002) an das Mausmodell angepasst und in unserer Arbeitsgruppe gering modifiziert.

Nach einer Inhalationsnarkose mit 1,5 – 2,5 % Isofluran in einem Lachgas/Sauerstoff-Gasgemisch (30 % / 60 %) erfolgte die Präparation der Schädelkalotte. Anschließend wurde der Vorderpfotenregion entsprechend (Paxinos 2001) 1,0 mm anterior zum Bregma und 1,8 mm lateral der Mittellinie eine fiberoptische Kaltlichtquelle mit 1,8 mm Blendenöffnung (KL 1500, Schott, Jena, Deutschland) positioniert und für 15 min mit 3200 Kelvin ein Lichtreiz gesetzt. Drei intraperitoneale Injektionen des photosensiblen Farbstoffes Bengalrosa (10 mg/ml in 0,9 % NaCl; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurden in einem Intervall von 5 min appliziert, beginnend 5 min vor der Belichtung (**Abb. 2**). Nach der Operation verblieben die Tiere in Käfigen bei einem 12 h Tag / 12 h Nachtrhythmus.

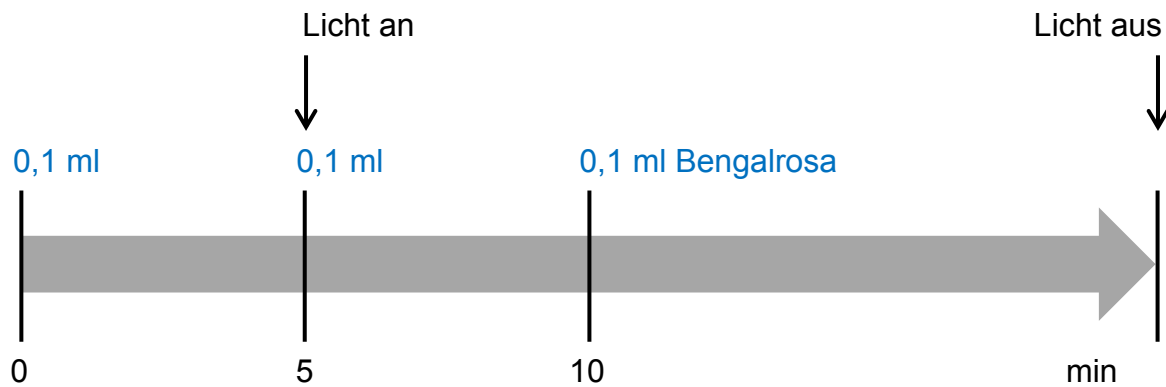


Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf der dreifachen intraperitonealen Bengalrosainjektion. Die stereotaktische Beleuchtung beginnt mit der zweiten Injektion und erfolgt über 15 min.

4.2. Experimentelles Design

Zur Analyse Doublecortin (DCX) – positiver Zellen in der Infarktumgebung erhielten alle Tiere nach Infarktinduktion über vier Tage zwei intraperitoneale Injektionen von 5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU, 50 mg/kg) im Abstand von 2 Stunden. Es wurden 4 Tierexperimentgruppen mit unterschiedlichen Überlebenszeiten gebildet. (**Abb. 3**).

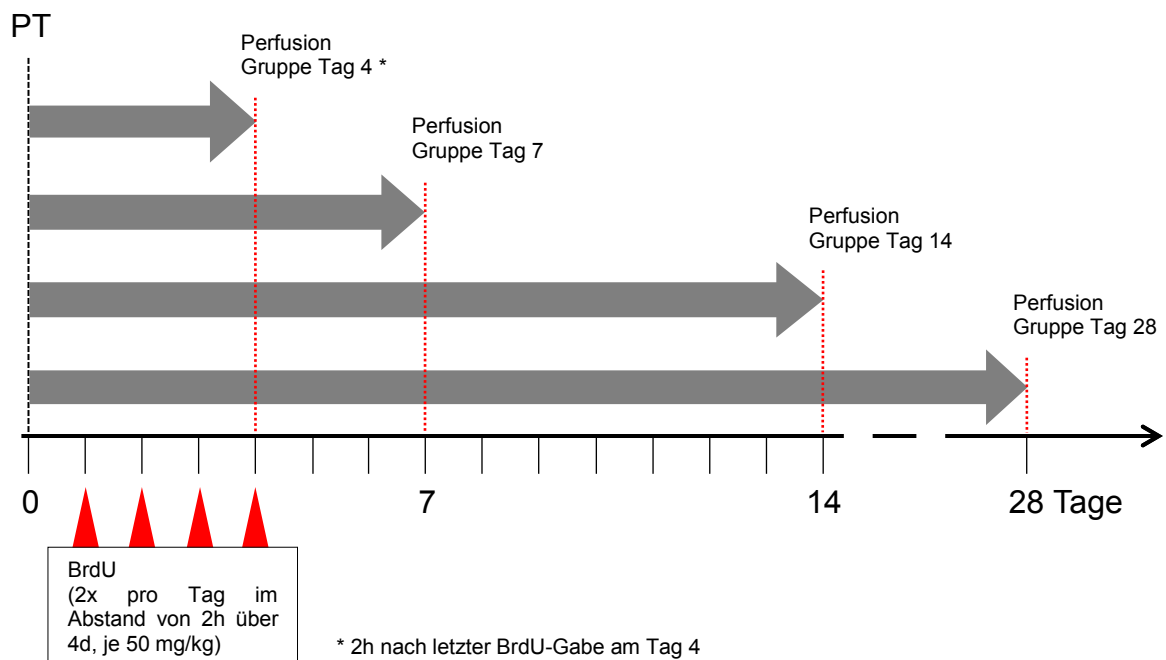


Abbildung 3: Experimentelles Design. Nach Induktion der Photothrombose (PT) erhielten alle vier Tiergruppen eine BrdU – Injektion. Die Perfusion erfolgte am Tag 4, 7, 14 und 28.

4.3. Gewebepräparation

Nach der Anästhesie der Tiere mit Diethylether erfolgte die transkardiale Perfusion mit 4 %-iger phosphatgepufferter Paraformaldehydlösung (PFA; 0,15 mol/L, pH 7,4). Im Anschluss wurden die Gehirne freipräpariert, entnommen und über Nacht in 4 % PFA – Lösung nachfixiert. Die 24-stündige Lagerung der Gehirne erst in 10 %-iger und dann für weitere 24 h in 30 %-iger phosphatgepufferter Saccharoselösung sorgte für eine Kryoprotektion. Bei - 30 °C wurden die Gehirne in Methylbutan tiefgefroren und bei - 80 °C zur weiteren Präparation aufbewahrt. Nach Anfertigung von 40 µm dicken sequentiellen Koronarschnitten am Gefriermikrotom (Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden die Schnitte in phosphatgepufferter Anti – Gefrierlösung bei - 20 °C zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

4.4. Immunhistochemie

Die Peroxidasetechnik wurde zur immunhistochemischen Färbung angewandt. Jeder 12. Hirnschnitt mit einem Infarkt der Vorderpfotenregion wurde zur Blockierung der endogenen Peroxidasen für 30 min in 0,6 % Wasserstoffperoxid in Trisgepufferter Salzlösung (TBS) inkubiert, gewaschen, für 30 min. in TBS – Plus (0,1 % Triton in TBS und 5 % Donkey Serum) geblockt und anschließend mit dem primären Antikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Inkubation mit dem 2. Antikörper erfolgte nach dem Waschen mit TBS und dem neuerlichen Blockieren mit TBS – Plus für 2 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem TBS – Waschen wurden die Schnitte für 1 h mit Avidin Biotin (AB) – Reagenz (Vektor Laboratories, Burlingame, CA) inkubiert, anschließend gewaschen und dann für 8 min in DAB – Lösung (0,25 mg/ml, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gefärbt. Es folgte das Aufziehen der Schnitte in 0,5 %-iger Gelatine und im letzten Schritt nach der Lufttrocknung das Eindeckeln mit Entellan.

Antikörper	Firma	Verdünnung
<i>primäre Antikörper</i>		
Goat anti DCX	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	1:500
<i>sekundäre Antikörper</i>		
Biotin-conjugated Donkey anti-goat IgG	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Suffolk, England	1:500

Tabelle 1: Auflistung der Antikörper für Immunhistochemie / Peroxidasereaktion.

4.5. Immunfluoreszenz

Dreifach – Immunfluoreszenzfärbungen wurden zur Charakterisierung der Zellen in der Infarktumgebung mit Antikörpern gegen den Migrationsmarker DCX, den Proliferationsmarker BrdU und den Astrozytenmarker GFAP (glial fibrillary acidic protein) durchgeführt. In Kombination mit DCX und BrdU wurden weitere zahlreiche Marker zur näheren Charakterisierung der Zellen in der Infarktumgebung herangezogen, welche in **Tabelle 2** gelistet sind. Jeder zwölfte Schnitt mit Infarktareal ging in die Auswertung mit ein. Nach der Denaturierung der Schnitte für 30 min in 2 N Salzsäure folgte die Inkubation in 0,1 M Borsäure für 10 min. TBS wurde als Waschmittel und anschließend TBS-Plus mit 5 % normal donkey-Serum oder 5 % goat-Serum zur 30 minütigen Blockung genutzt. Bei 4 °C wurden für 24 h die drei Antikörper (gegen DCX, BrdU und GFAP) inkubiert. Erneutes Waschen mit TBS und 30 minütiges Blocken mit TBS-Plus, dann Inkubation der sekundären Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur. Nach gewissenhaftem Waschen wurden die Schnitte mit 5% Gelatine aufgezogen, danach luftgetrocknet und anschließend mit Mowiol, einem wasserlöslichen Eindeckmedium, eingedeckt.

Antikörper	Firma	Verdünnung
<i>primäre Antikörper</i>		
Goat anti DCX	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	1:500
Guinea-pig anti DCX	Millipore, Temecula, CA, USA	1:200
Rat anti BrdU	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland	1:500
Mouse anti GFAP	Millipore, Temecula, CA, USA	1:500
Rabbit anti NG2	Millipore, Temecula, CA, USA	1:200
Rabbit anti S100β	Swant, Bellizona, Schweiz	1:2000
Mouse anti CD68	Serotec, Oxford, UK	1:500
Rabbit anti Sox2	Abcam, Cambridge Science Park, UK	1:1500
Mouse anti CNPase	Abcam, Cambridge Science Park, UK	1:500
Rabbit anti Pax6	Covance, Berkeley, CA, USA	1:500
Rabbit anti DCL	Provided by Bjarte Harvik, Bergen, Norwegen	1:1000
Mouse anti NeuN	Millipore, Temecula, CA, USA	1:500
<i>sekundäre Antikörper</i>		
Alexa Fluor 488 rat anti goat	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	1:250
Alexa Fluor 488 goat anti guinea-pig	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	1:500
Alexa Fluor 488 donkey anti mouse	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	1:500
Rhodamin donkey anti rat	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:500
CY5 donkey anti goat	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:500
CY5 donkey anti rabbit	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:500

Tabelle 2: Antikörper für Immunfluoreszenz.

4.6. Quantifizierung und konfokale Lasermikroskopie

Die durch die Peroxidasefärbung dargestellten BrdU – und DCX – positiven Sternzellen wurden mit dem Lichtmikroskop quantitativ mit Hilfe der optischen Fraktionierungsmethode, ein semi-automatisches, stereologisches System, ausgewertet. In die Berechnung ging jeder 24. Schnitt unserer Präparate ein. Die

Zählung der entsprechenden Zellen erfolgte in der periläsionalen Umgebung, welche zur besseren Vergleichbarkeit in drei Areale unterteilt wurde: i) ein mediales und ii) laterales Areal – zusammen als Kortex bezeichnet und iii) der Corpus Callosum – Region (CC – Region) – tiefe kortikale Schichten sowie das Corpus Callosum umfassend. Definiert wurde jeweils ein 350 μm weiter Rahmen, welcher direkt dem Infarkt anliegt, ein 80 x 80 μm^2 Zählrahmen (counting frame) sowie ein 100 x 180 μm^2 Stichprobenraster (sampling grid). Um mehrfach Zählungen der Zellen im interessierten Areal zu vermeiden, erfolgten die Ausmessung der Schichtdicke und, dieser angepasst, die Festlegung eines Sicherheitsabstandes, den sogenannten „guard zones“. Mit einem 5 – fachen Objektiv wurden die einzelnen Infarktareale umrandet und anschließend mit dem 63 – fachen Öl – Objektiv die DCX – positiven Zellen ausgezählt. Positive Zellen, welche die obere, untere oder laterale Begrenzung teilweise überschritten, wurden aus der Berechnung ausgeschlossen. Weiterhing erfolgte die Hochrechnung der BrdU – positiven Zellen als absolute Zahlen je mm^3 . Die Quantifizierung der DCX – positiven Polarzellen erfolgte in demselben definierten Periinfarktareal wie bei den Sternzellen aufgrund der überschaubaren Menge jedoch per Hand.

Mit dem konfokalen Lasermikroskop LSM Meta 710 (Zeiss, Deutschland) erfolgte die Phänotypisierung DCX – positiver Zellen. Die Fluoreszenzfarbstoffe der sekundären Antikörper Rhodamin Red (554 nm), Alexa Fluor (488 nm) und Cy5 (650 nm) werden von entsprechenden Lasern (Helium-Neon 1, Argon, Helium-Neon 2) angeregt. In den drei Arealen i) medialer, ii) lateraler Kortex und der CC – Region wurden Z-Stacks mit einem 40 – fachen Öl – Objektiv durchgeführt, die erfassten Schichten übereinandergelegt und die darin enthaltenen Zellen hinsichtlich ihrer Kolokalisation weiter spezifiziert. Die absolute Zellanzahl der kolokalisierten Zellen ergab sich aus der Multiplikation der zuvor in der DAB-Färbung quantifizierten DCX – positiven Sternzellen und dem prozentualen Anteil der markertragenden Zellen. Für die Quantifizierung und Phänotypisierung wurde jeder 12. Schnitt gescannt.

4.7. Statistik

Die mit dem Statistikprogramm SPSS Version 19.0[®] für Windows ermittelten Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Der

Kruskal – Wallis – Test wurde bei nicht – parametrischer Datenverteilung angewandt und anschließend zur Prüfung der Daten die exakten Signifikanzen anhand des Mann – Whitney – U – Tests ermittelt. P-Werte $< 0,05$ galten als statisch signifikant. Die ipsilaterale Schlaganfallseite wurde mit der kontralateralen, gesunden Seite als Kontrolle für die vier festgelegten Zeitpunkte verglichen.

5. Ergebnisse

5.1. Morphologie der photothrombotischen Infarkte

Alle in die Analyse einbezogenen Tiere innerhalb der experimentellen Untergruppen zeigten einen typischen Infarkt im Bereich des sensomotorischen Kortex. Der Infarkt betraf alle Schichten der Hirnrinde. Der mediolaterale Durchmesser der Läsion betrug $1,2 \pm 0,4$ mm ($n = 10$).

5.2. Identifizierung zweier DCX⁺-Zellpopulationen in der Infarktumgebung

Die periläsionale Zone wurde zur besseren Übersicht in drei Abschnitte unterteilt: i) medialer Kortex, ii) lateraler Kortex, zusammengefasst als die Kortex – Region, und iii) Corpus Callosum (CC – Region). Die CC – Region umfasst hierbei das Corpus Callosum und zusätzlich tiefer gelegene Schichten der Rinde (**Abb. 4**).

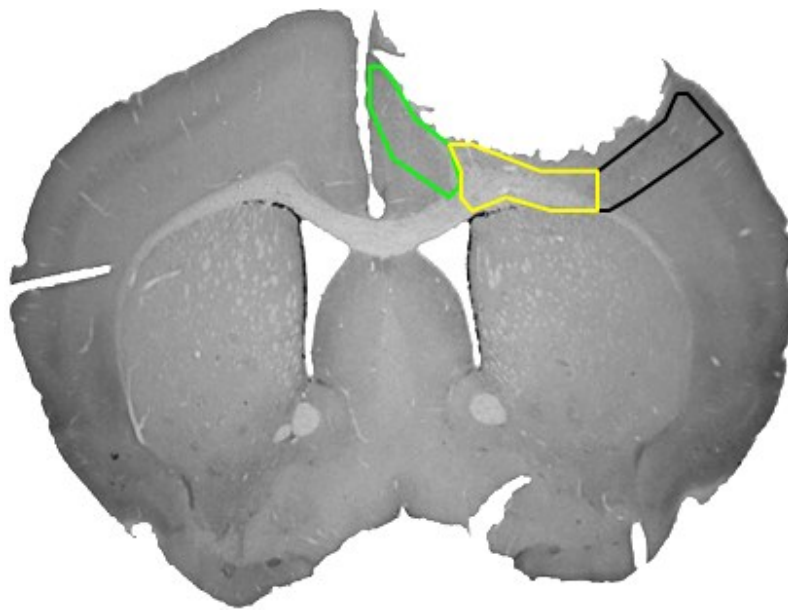


Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung des Maushirns mit drei Infarktregionen: Medial (grün), Corpus Callosum (CC – Region) (gelb) und Lateral (schwarz). Die laterale und mediale Infarktregion wird als Kortex – Region zusammengefasst.

DCX⁺ – Zellen wurden in der Infarktumgebung hinsichtlich ihrer Form und der Anzahl ihrer Fortsätze und deren räumlichen Orientierung stichprobenweise ausgewählt (n=30) und analysiert. Hierbei ergaben sich zwei Unterpopulationen (**Abb. 5**): der eine Zelltyp zeigte multiple, vom Zellkörper radiär wegführende Fortsätze, im Weiteren DCX⁺ – Sternzellen genannt. Der andere Zelltyp besaß lediglich einen oder zwei Fortsätze mit einer streng polaren Ausrichtung, von uns als DCX⁺ – Polarzellen bezeichnet. Die Intensität der DCX – Expression war in den Polarzellen konsequent stärker.

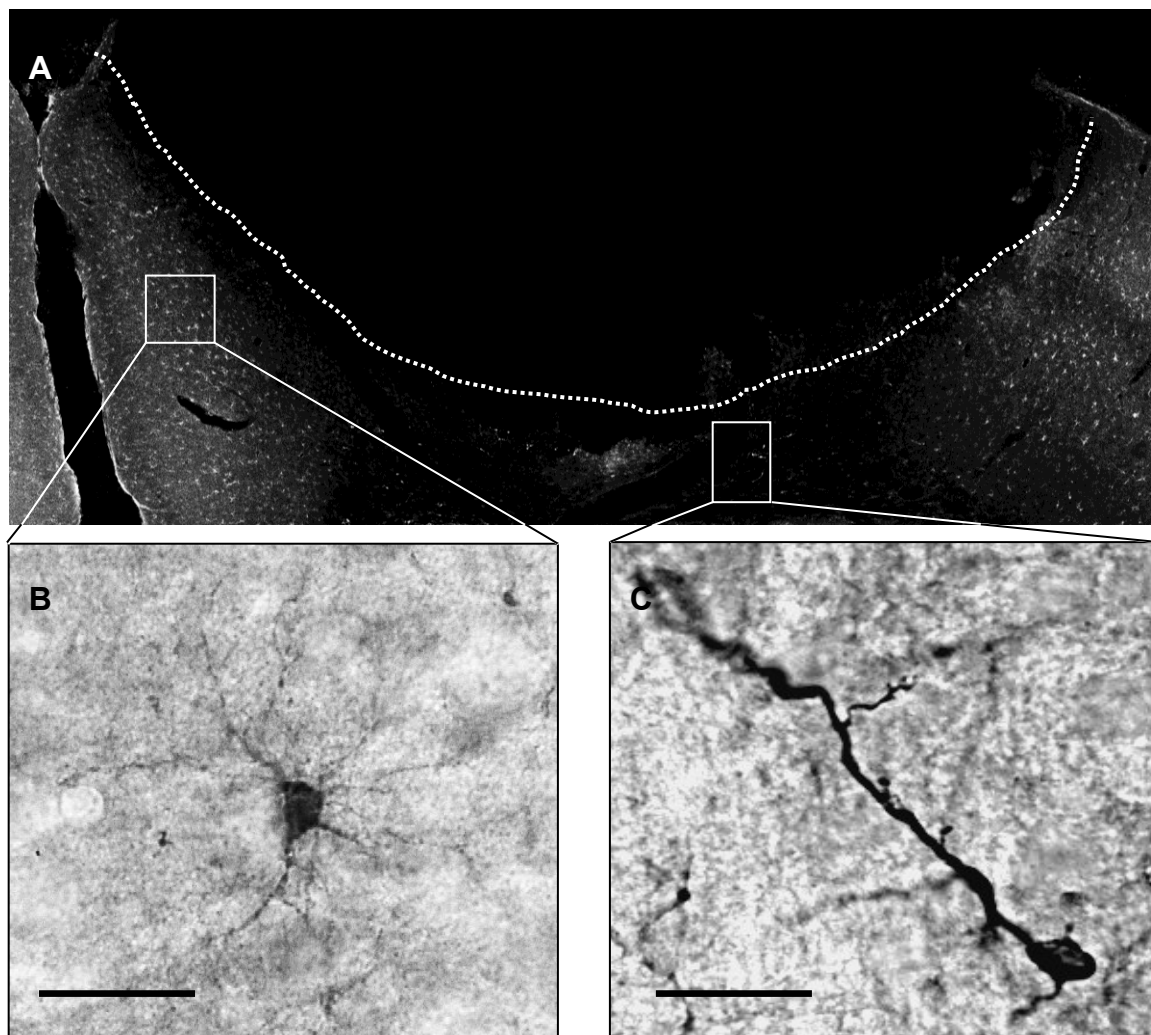


Abbildung 5: Repräsentative Bilder eines 40 µm Gehirnschnittes einer C57 – Maus nach immunhistochemischer DCX – Färbung. In der Infarktumgebung können zwei DCX⁺ – Zellen unterschieden werden. (A) Übersichtsaufnahme einer kortikalen Infarktregion. (B) Darstellung einer DCX⁺ – Zelle mit multiplen Fortsätzen und schwächerer Immunreaktionsfähigkeit, genannt DCX⁺ – Sternzelle. (C) Der zweite DCX⁺ – Zelltyp zeigt eine polare Morphologie mit einem oder zwei Fortsätzen, genannt DCX⁺ – Polarzellen. Man beachte auch die stärkere Signalintensität der DCX⁺ – Polarzellen. Skala 20 µm.

5.3. Quantifizierung der DCX⁺ – Zellen

Nach der Identifizierung der zwei Zellpopulationen erfolgte im nächsten Schritt mit Hilfe eines semiautomatisch – stereologischen Systems (Stereoinvestigator) die Quantifizierung der beiden Subpopulationen in der Infarktumgebung anhand der DAB – Immunhistochemischen Färbung. Es sollte geprüft werden, ob diese Zellen Unterschiede in ihrer Anzahl und räumlichen Verteilung innerhalb der drei von uns definierten Infarktzone aufweisen. Es zeigte sich bei der Mengenbestimmung der DCX⁺ – Sternzellen beim Vergleich des lateralen und medialen perifokalen Kortex kein signifikanter Unterschied. Aus diesem Grund wurden die Mittelwerte der jeweiligen Daten dieser beiden Regionen gebildet und alles als Kortex – Region in den Ergebnissen zusammengefasst (**Abb. 6**).

Es ergab sich bei der Mengenbestimmung der DCX⁺ – Sternzellen ein signifikanter Anstieg der Zellanzahl um den Faktor 2,54 in der infarktnahen Kortex – Region am Tag 4 (7286 ± 1009 Zellen/mm³ versus 2872 ± 246 Zellen/mm³, $p < 0,02$) (**Abb. 6**). Im Vergleich zur kontralateralen Seite blieb die Anzahl der DCX⁺ – Sternzellen dauerhaft erhöht und zeigten nur am Tag 14 und 28 einen leichten Abfall (Tag 7: 2,54-fache, Tag 14: 2,1-fache, Tag 28: 1,45-fache). Die Anzahl der DCX⁺ – Sternzellen der kontralateralen Seite änderte sich während der vier Messzeitpunkte nicht. In der CC – Region beobachteten wir eine ähnliche Zunahme der Zellen wie in der infarktnahen Kortex – Region. Auszählungen ergaben einen 2,36-fachen Anstieg dieser Zellen am Tag 4 (8328 ± 1243 vs. 3531 ± 234 Zellen/mm³, $p < 0,02$) (**Abb. 6**). Dieser Anstieg hatte am Tag 4 seinen Höhepunkt, fiel über den übrigen Experimentierzeitraum wieder ab, blieb aber jederzeit oberhalb der Kontrollwerte (Tag 7: 2,46-fach, $p < 0,05$; Tag 14: 2,19-fach, $p < 0,05$; Tag 28: 1,60-fach, $p < 0,05$).

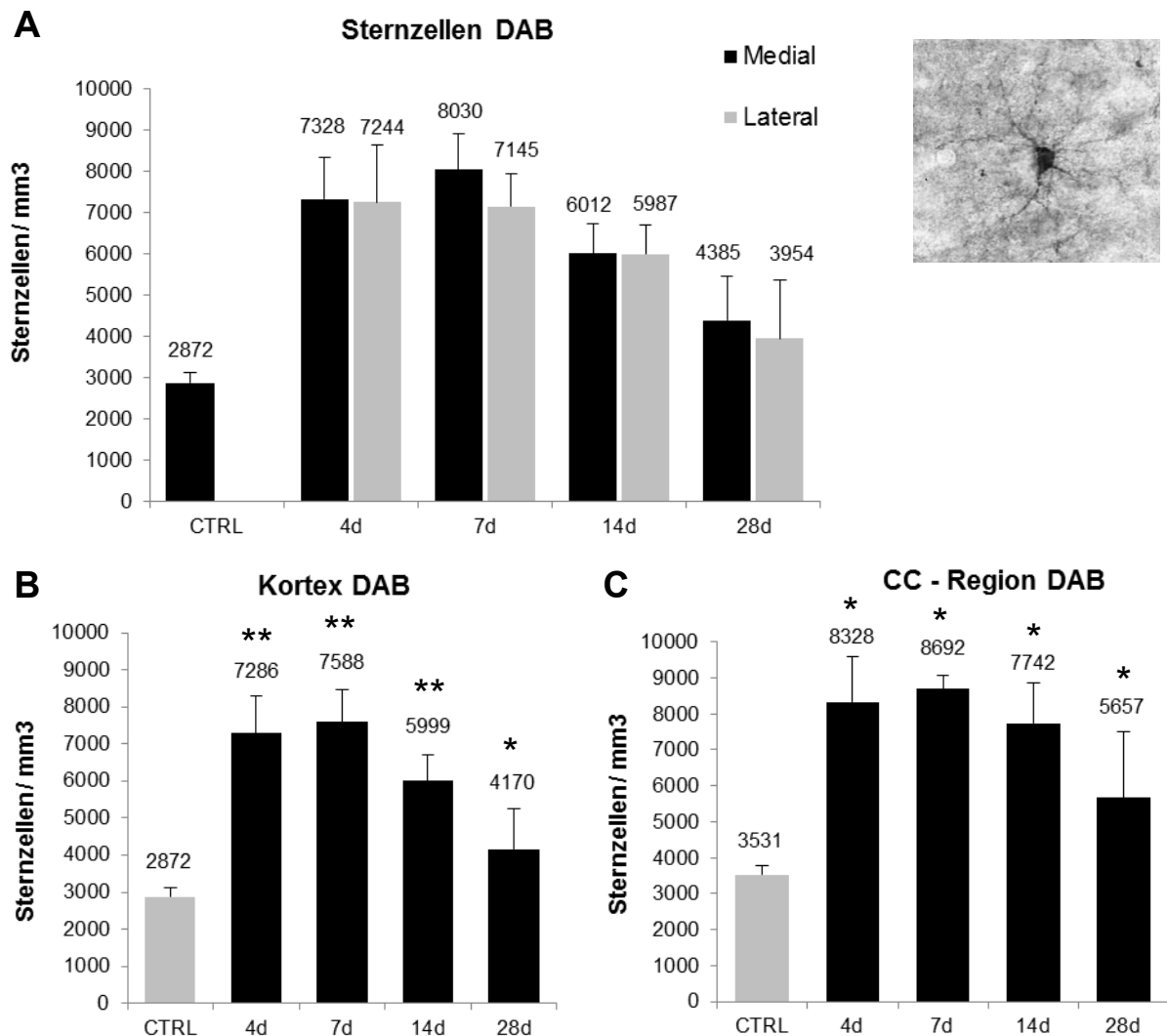
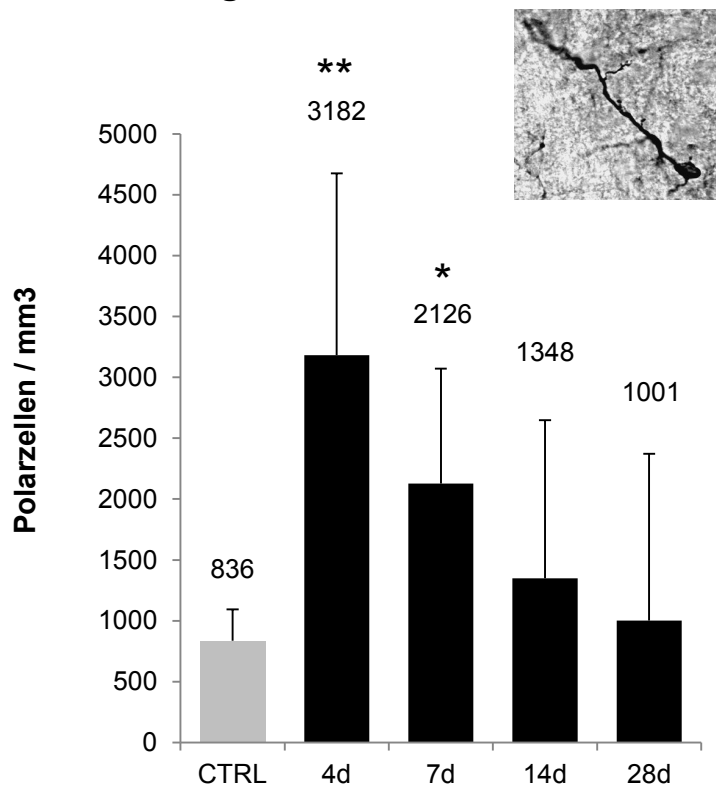


Abbildung 6: Quantifizierung der DCX⁺ – Sternzellen in den Infarktzone „Medial“ und „Lateral“ (A). Hierbei ergeben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellanzahl. Deshalb werden die Ergebnisse beider Infarktzone zur „Kortex“ – Region zusammengefasst (B). Die Sternzellen sind in der Kortex – Region und in der CC – Region im Vergleich zur Gegenseite (CTRL) zu jedem Zeitpunkt signifikant häufiger vertreten. Die Anzahl der Sternzellen erreicht in beiden Regionen zum Zeitpunkt 7d ihren Höhepunkt, um dann kontinuierlich abzufallen (B + C). Signifikanzen: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,02$ (MWU – Test). Fehlerindikator T entspricht dem Mittelwert \pm Standardabweichung.

Die aufgrund der geringen Anzahl vertretenen, per Hand ausgezählten DCX^+ – Polarzellen wurden ausschließlich in der CC – Region registriert. Auch ein Scannen der Schnitte durch einen weiteren Untersucher bestätigte dieses Ergebnis. Im Vergleich zur Gegenseite zeigten die Polarzellen in der CC – Region bereits während früher Beobachtungszeitpunkte einen signifikanten Anstieg (Tag 4: 3,8-fach, $p < 0,02$; Tag 7 2,54-fach, $p < 0,05$; Tag 14: 1,61-fach, nicht signifikant; Tag 28: 1,2-fach, nicht signifikant). Im Verlauf nähert sich der Wert dem Kontrollwert der Gegenseite allmählich wieder an und ist bereits ab Tag 14 nicht mehr signifikant (**Abb. 7**).

A CC- Region DAB



B

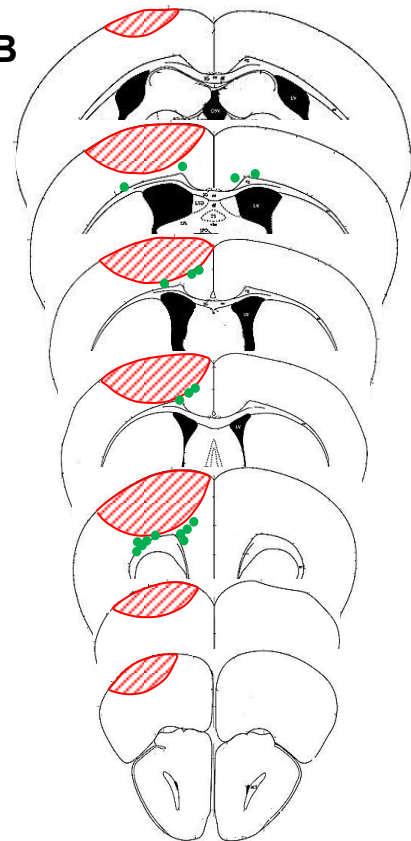


Abbildung 7: Die DCX^+ – Polarzellen sind lediglich in der CC – Region in sehr geringer Zellanzahl vertreten. Im Vergleich zur Gegenseite (CTRL) steigen sie am Tag 4 bereits auf signifikante Werte und nähern sich am Ende unseres Beobachtungszeitraumes am Tag 28 dem Kontrollwert wieder an (A). Schematische, beispielhafte Darstellung der Lokalisation der DCX^+ – Polarzellen (grüne Punkte) anhand eines Maushirns (B). Signifikanzen: ** = $p < 0,02$, * = $p < 0,05$ (MWU – Test). Fehlerindikator T entspricht dem Mittelwert \pm Standardabweichung.

Zusammenfassend sind die DCX⁺ – Sternzellen gehäuft in der periläsionalen Region zu finden. Sie weisen in der Kortex – und CC – Region ein ähnliches Verteilungsmuster aufweisen und sind zu allen Beobachtungszeitpunkten durchgehend erhöht. Im Gegensatz dazu waren die DCX⁺ – Polarzellen im Vergleich zur Kontrollseite ausschließlich in der CC – Region und dann besonders zu frühen Zeitpunkten nachweisbar.

5.4. Proliferationsfähigkeit der beiden DCX⁺ – Zellpopulationen

Die Charakterisierung der Proliferationsaktivität der beiden Zellpopulationen erfolgte mittels intraperitonealer BrdU – Markierung. 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidinanalogon und wird in der Synthesephase des Zellzyklus in die DNA anstelle der Pyrimidinbase Thymidin eingebaut. Inkorporiertes BrdU ist danach über Wochen und Monate mit entsprechenden Antikörpern nachweisbar. Am Tag 4 zeigten 17% der DCX⁺ – Sternzellen eine BrdU – Expression in jeweils der Kortex – und CC – Region und zählen damit zu den Zellen, die aus postischämischer Mitose hervorgegangen sind. Dieser Wert ist bereits am Tag 4 im Vergleich zur Gegenseite hochsignifikant ($p < 0,02$) und wird bis zum Tag 28 diese Eindeutigkeit beibehalten. Zu späteren Zeitpunkten (Tag 7 bis Tag 28) stieg der Anteil der BrdU⁺ – Sternzellen weiterhin an und gibt somit Hinweis auf eine nach dem 4. Experimenttag stetig folgende Teilungsaktivität (**Abb. 8**). Ein kontinuierlicher, signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg der DCX⁺ – Sternzellen ist in der CC – Region zu verzeichnen. Zum letzten Beobachtungszeitraum macht die Anzahl der DCX⁺/BrdU⁺ – Sternzellen etwas unter zwei Drittel (60 %) der DCX⁺ – Sternzellen aus. Analysen des Proliferationsmarkers in den DCX⁺ – Polarzellen ergaben eine Koexpression mit BrdU in 26% der Zellen am Tag 4 (**Abb. 8**). Hinsichtlich der BrdU – Kennzeichnung gab es zum Vergleich mit der Gegenseite keine erkennbare Differenz. Hier zeigten sich ebenfalls 32 % der Polarzellen DCX⁺/BrdU⁺. Auch unter Betrachtung anderer Zeitpunkte ließ sich kein signifikanter Unterschied erkennen. Demnach findet ein Proliferationsanstieg vornehmlich bei den Sternzellen der ipsilateralen Hemisphäre statt.

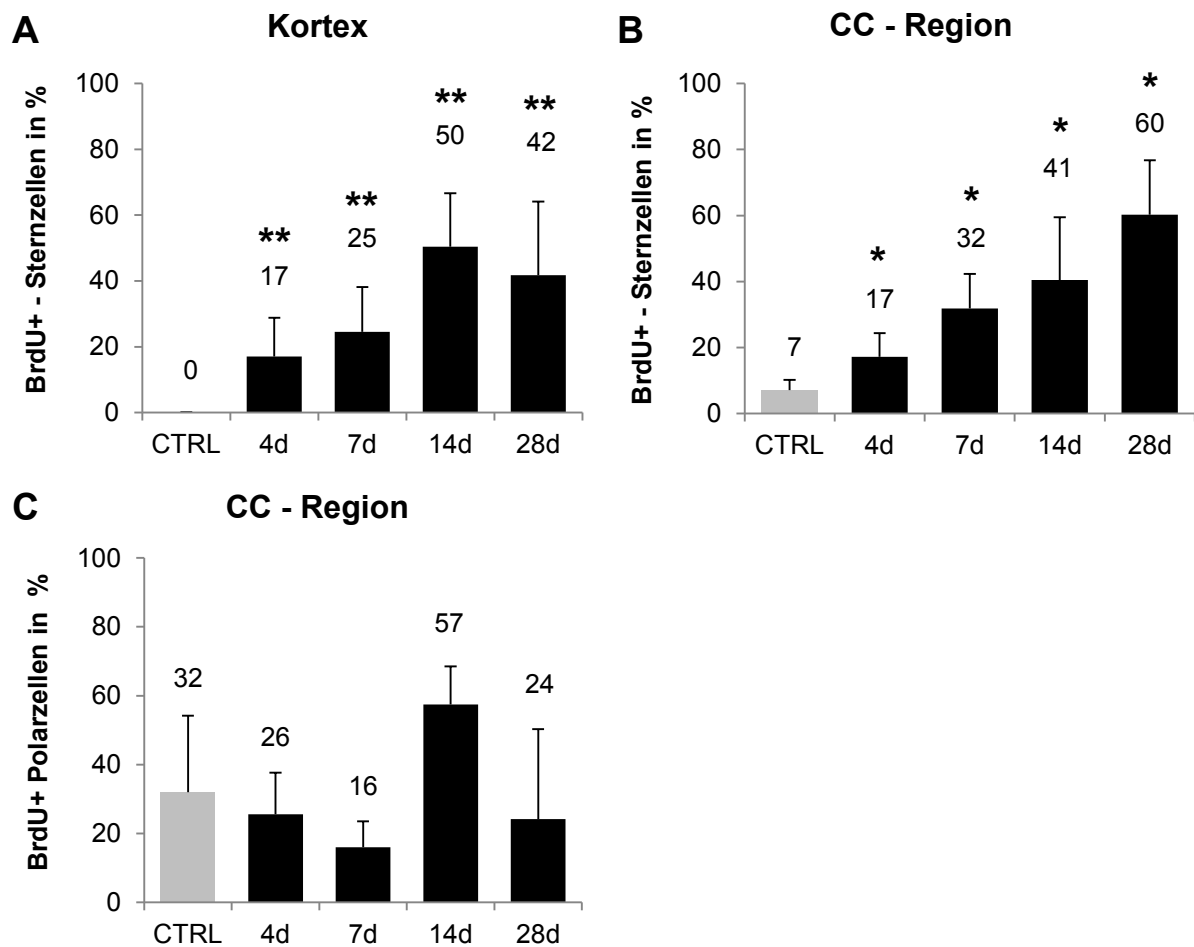


Abbildung 8: A) Prozentuale Darstellung der DCX⁺/BrdU⁺ – Sternzellen in der Kortex – Region mit dem Höhepunkt der Proliferation zum Zeitpunkt 14d. B) Prozentuale Darstellung der DCX⁺/BrdU⁺ – Sternzellen in der CC – Region mit einem kontinuierlichen, signifikanten Anstieg. C) Die DCX⁺/BrdU⁺ – Polarzellen zeigen zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Gegenseite (CTRL). Signifikanzen: ** = $p < 0,02$, * = $p < 0,05$ (MWU – Test). Fehlerindikator T entspricht dem Mittelwert \pm Standardabweichung.

5.5. Phänotypisierung der DCX⁺ – Sternzellen

Zur Klärung der Frage, ob die beiden DCX⁺ – Zellpopulationen glialen oder neuronalen Ursprungs sind, erfolgte im Anschluss an die Verteilungs- und Proliferationsanalysen die Untersuchung der Koexpression anderer zytochemischer Marker. Das saure Gliafaserprotein (engl. GFAP: **G**lial **f**ibrillary **a**cidic **p**rotein) kommt als Intermediärfilament im Zytoplasma von Gliazellen, vornehmlich in reifen Astrozyten, vor. Eine amerikanische Studie untersuchte im Rahmen von traumatischen Hirnverletzungen 2001 die Reaktion des umliegenden Hirngewebes in der neben dem Gyrus dentatus auch betroffene Rindenareale in die Analysen mit einbezogen wurden (Kernie et al. 2001). Sie kamen zu dem Schluss, dass die im Kortex hochregulierten Zellen durch den Infarkt aktivierten Astrozyten entsprachen und sie nicht zur Migration fähig seien. Spätere Studien jedoch haben durch den Markernachweis von Doublecortin in diesen Zellen die Fähigkeit der Migration wieder ins Spiel gebracht (Keiner et al. 2009). Ein weiterer glialer Zellmarker S 100 β ist ein Protein, welches zur Multigen-Familie S 100 gehört. Die Calcium-bindenden Proteine werden in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert und können für diagnostische Zwecke (Schädel-Hirn-Trauma) bestimmt werden (Kernie et al. 2001). Die Färbung unserer Maushirne mit den glialen Markern GFAP und S 100 β ergab, dass > 80 % der DCX⁺ – Sternzellen in der Kortex – und Corpus Callosum – Region GFAP und S 100 β koexprimieren, wobei eine fast vollständige Übereinstimmung von GFAP und S 100 β vorlag (**Abb. 9 und Abb. 10 / Tab. 3**). Die Koexpression von DCX und GFAP war in den Sternzellen der Kortex – Region zu allen Zeitpunkten signifikant höher als auf der kontralateralen Seite. Am Tag 7 war mit 93 % die Mehrheit der DCX⁺ – Sternzellen ebenfalls GFAP⁺. Bis zum Tag 28 fiel die Anzahl dann wieder etwas ab und hatte dann noch einen Wert von 77 %. In Korrelation mit den Auswertungen von DCX⁺/BrdU⁺ – Sternzellen der Gegenseite zeigt sich auf der kontralateralen Seite ebenfalls keine Sternzelle, welche DCX, BrdU und GFAP aufweist. Ipsilateral sind nach 2 Wochen 41 % der DCX⁺ – Sternzellen BrdU und GFAP positiv. In der Corpus Callosum – Region zeigt sich nach einem Monat, dass von den 60 % DCX⁺/BrdU⁺ – Sternzellen ca. 57 % ebenfalls GFAP/S 100 β koexprimieren. Interessanterweise konnten in 8 % der DCX⁺ – Sternzellen in der Corpus Callosum – Region der Kontrollseite BrdU und GFAP nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte die Bereitstellung migrationsfähiger Gliazellen für den Fall der Gehirnschädigung und im Rahmen der allgemeinen Regeneration sein. Es ist aber auch möglich, dass die im

Corpus Callosum gelegenen Sternzellen aufgrund der Ischämie der Gegenseite in sehr geringem Ausmaß mit aktiviert wurden, sie aber keine weiteren Signale erhielten, um in die gesunde Kortex – Region abzuwandern (CTRL 0 %) (**Abb. 10**). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es einen stark signifikanten Anstieg der DCX⁺/GFAP⁺ – Sternzellen in der Kortex – Region gibt aber nur bis zu maximal 41 % dieser Sternzellen postischämisch aus dem Prozess der Mitose hervorgehen. Wobei in der kontralateralen Corpus Callosum – Region bereits initial 65 % der Sternzellen DCX⁺/GFAP⁺ sind, kommt es hier zu keinem signifikanten Anstieg, sondern vielmehr zu einem fast signifikanten Abfall der DCX⁺/GFAP⁺ – Sternzellen auf 53 % am 28. Tag. Interessanterweise zeigt sich bei diesen Zellen aber, dass der prozentuale Anteil der postischämisch hervorgegangenen Zellen kontinuierlich ansteigt und am letzten Tag 57 % der Sternzellen DCX⁺/BrdU⁺/GFAP⁺ sind und damit de facto aktivierten Astrozyten entsprechen. Ein weiterer Anstieg in der Corpus Callosum – Region ist hier nicht ausgeschlossen.

Die DCX⁺ – Polarzellen hingegen zeigen weder eine Expression von glialen Markern noch von anderen in der Studie untersuchten Markern (**Abb. 9 / Tab. 3**).

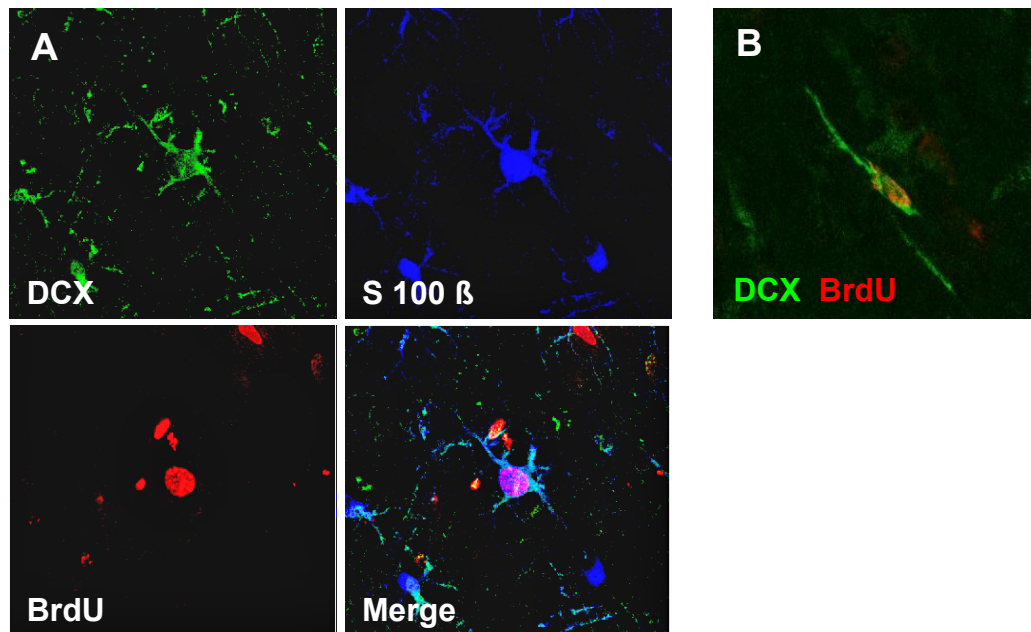


Abbildung 9: A) MIP – Darstellung (Maximum Intensity Projection) eines konfokalen Laserscans einer DCX⁺/BrdU⁺/S100β⁺ – Sternzelle im perifokalen, kortikalen Infarktgebiet. DCX und S 100 β reichern sich im Zellsoma und den Zellfortsätzen an. BrdU ist auf den Zellkern lokalisiert. Das Markerverhalten von GFAP ist dem von S 100 β gleichzusetzen. B) MIP – Darstellung einer im Corpus Callosum gelegenen DCX⁺/BrdU⁺ – Polarzelle.

Marker	Sternzellen	Polarzellen
BrdU	+	+
DCX	+	+
GFAP	+	-
S 100 β	+	-
CD68	-	-
CNPase	-	-
DCL	-	-
Iba 1	-	-
NeuN	-	-
Pax6	-	-
Sox2	-	-

Tabelle 3: Immunfluoreszenzergebnisse der verwendeten zytochemischen Marker für die Phänotypisierung der Stern- und Polarzellen.

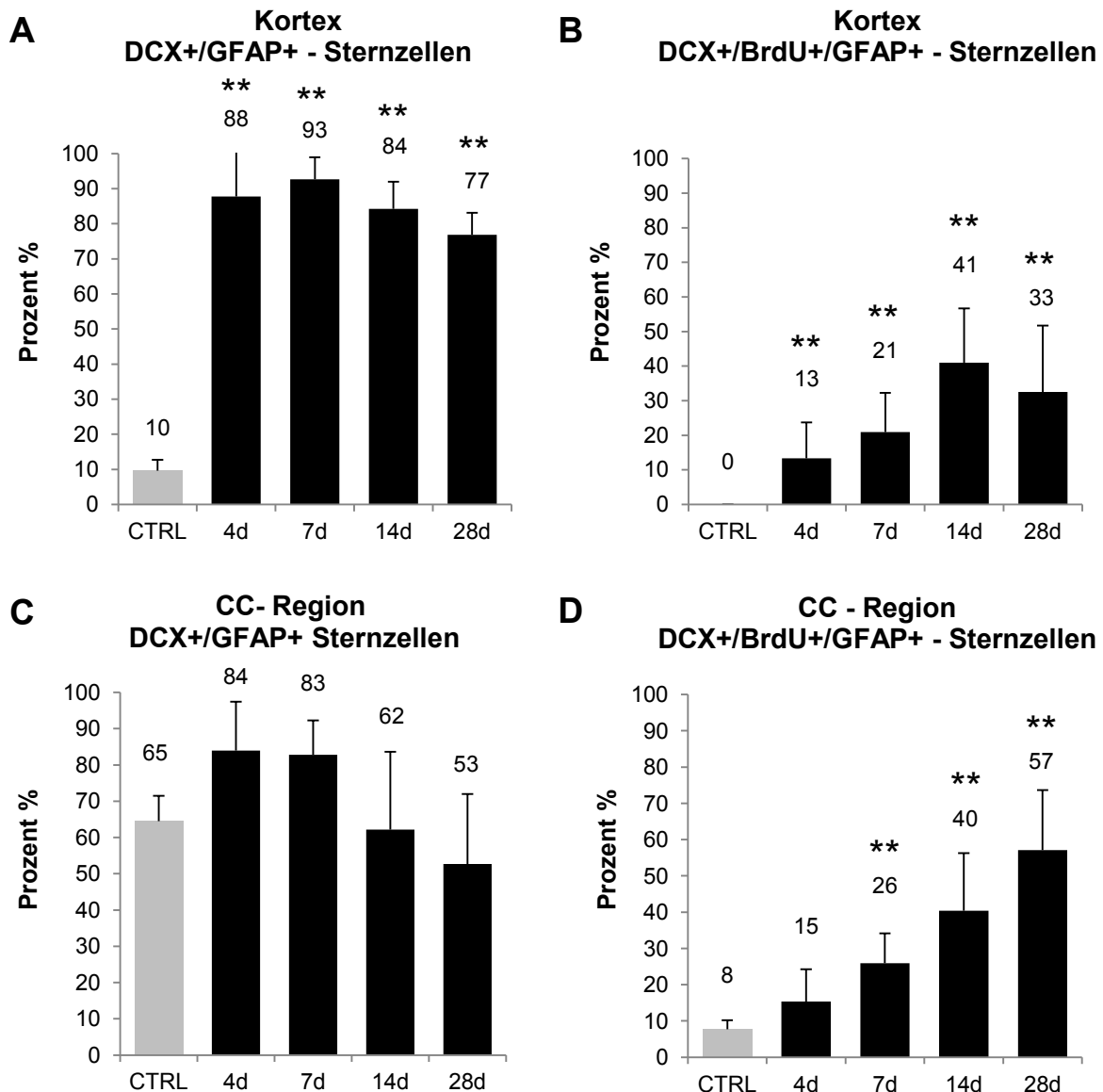


Abbildung 10: Darstellung der DCX⁺/BrdU⁺ – Sternzellen der Kortex – (A) und Corpus Callosum – Region (C) in Prozent. B) Prozentuale Darstellung der im Kortex DCX⁺/BrdU⁺/GFAP⁺ – Sternzellen. Bis zum Tag 14 erfolgt ein stetiger Anstieg der dreifach-positiven Sternzellen und hat zu diesem Zeitpunkt sein Maximum mit 41 %. Ein leichter Abfall zeichnet sich am Tag 28 ab, bei dem aber immer noch ein Drittel der detektierten DCX⁺ – Sternzellen ebenfalls BrdU und GFAP exprimieren. Interessanterweise zeigt sich auf der kontralateralen Seite (CTRL) nicht eine DCX⁺ – Sternzelle mit gleichzeitiger Expression von BrdU und GFAP. Im Gegensatz dazu weist die Kontrolle in der Corpus Callosum – Region 8 % DCX⁺/BrdU⁺/GFAP⁺ – Sternzellen auf (D). Bis zum Tag 28 ist ein stetiger Anstieg erkennbar und hat mit 57 % hier seinen detektierten Höhepunkt. Signifikanzen: * = p<0,05, ** = p<0,02 (MWU – Test). Fehlerindikator T entspricht dem Mittelwert ± Standardabweichung.

Neben GFAP und S 100 β wurden zur weiteren Phänotypisierung zusätzliche Immunfluoreszenzfärbungen mit glialen Markern durchgeführt (**Tabelle 3**). Unsere Überlegungen schlossen die Möglichkeit ein, dass die DCX⁺ – Sternzellen unter anderem Oligodendrozyten während der Differenzierungsphase sein könnten. Der spezifische Marker dafür CNPase (2';3'-**C**yclic-**n**ucleotide 3'-**p**hosphodiesterase) (Takasaki et al. 2010) war ebenso wie die Marker für aktivierte Mikroglia Iba 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) und Immunzellen wie z. B. Monozyten oder Makrophagen CD68 (**C**luster of **D**ifferentiation) (Inacio et al. 2011) nicht in den DCX⁺ – Sternzellen nachweisbar. Bezogen auf die DCX⁺ – Polarzellen überraschte uns das negative Ergebnis dieser Marker nicht. Hinsichtlich der Polarzellen hätten wir eher eine Koexpression von Pax6 und Sox2 erwartet. Pax6 (**P**aired box protein) (Osumi et al. 2008) ist ein multifunktionaler Transkriptionsfaktor für nachweislich embryonale und adulte Neurogenese. Sox2 (**s**ex determining region Y **b**ox 2) ist bekannt für Pluripotenz und die Aufrechterhaltung von embryonalen und neuronalen Stammzellen. Leider konnten wir keinerlei Koexpression dieser Marker in den DCX⁺ – Stern – und Polarzellen observieren.

Bemerkenswerterweise wurde ebenfalls der Marker NeuN (**N**euronal **N**uclei), welcher spezifisch für reife Neuronen ist (Mullen et al. 1992), von keinem der beiden Zelltypen innerhalb des Beobachtungszeitraumes exprimiert. In einer Studie von Magavi et al. konnte ebenfalls keine Übereinstimmung kortikaler Zellen in der Infarktumgebung mit diesem Marker festgestellt werden (Magavi et al. 2000).

Zusätzlich erfolgte eine Analyse hinsichtlich des Expressionsmusters von Doublecortin-ähnlichem (DCL – **d**oublecortin-like) Protein mit Hilfe spezifischer Antikörper, welche uns von Bjarte Havik (Bergen, Norwegen) zur Verfügung gestellt wurden. Das DCL-Protein ist eine Splicingvariante der doublecortinähnlichen Kinase (DCLK1), die 73% der Aminosäurenidentität mit DCX über seine gesamte Länge von 362 Aminosäuren teilt und darüber hinaus zwei DCX Domänen besitzt (Vreugdenhil et al. 2007). DCL wird in sternförmigen glia-ähnlichen Zellen während der Embryogenese und in neuronalen Vorläuferzellen in der adulten SVZ exprimiert (Saaltink et al. 2012). In unserer Studie konnte keine DCL – Expression in den beiden untersuchten DCX⁺ – Zellpopulationen festgestellt werden.

Kürzlich gab es Berichte über unterschiedliche primäre Antikörper, welche eventuell variable DCX – Färbungsmuster ermöglichen (Liu et al. 2008). Der

Antikörper C18 (Santa Cruz Biotechnology), welcher spezifisch an der Carboxyl – Endgruppe des DCX – Proteins bindet, wurde daraufhin, wie auch schon in vorangegangenen Experimenten, angewendet und es ergaben sich zuverlässige, intensive Färbungen in neurogenen Regionen (Kunze et al. 2006, Kunze et al. 2009), wie auch im Rindenbereich (Keiner et al. 2008). Unsere Daten stimmen mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen überein, welche die Spezifität des C18 – Antikörpers hinsichtlich DCX analysierten (Brown et al. 2003, Liu et al. 2008). Um eine noch höhere Sicherheit zu erlangen, führten wir jedoch mehrere Testfärbungen mit einem anderen DCX – Antikörper der Firma Millipore (Temecula, CA, USA) durch. Hier ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Färbemuster. Abschließend fanden wir keinen Hinweis, dass die Detektion von DCX in den kortikalen Gliazellen durch ein fehlerhaftes Bindungsverhalten eines primären Antikörpers verursacht wurde.

Zusammenfassend konnten wir in unseren Untersuchungen zeigen, dass die Mehrzahl der DCX⁺ – Sternzellen glialen Ursprungs und sie postischämisch in der Kortex – Region sowie in der Corpus Callosum – Region zu finden sind. Die lediglich in der CC – Region nachweisbaren DCX⁺ – Polarzellen stellen wahrscheinlich migrierende Vorläuferzellen dar.

6. Diskussion

In unseren Experimenten konnten wir demonstrieren, dass DCX^+ – Zellen in der periläsionalen Zone keine homogene Zellpopulation darstellen, sondern dass zwei DCX^+ – Zelltypen unterschieden werden können. Der am häufigsten vertretene DCX^+ – Zelltyp wies eine sternförmige Morphologie auf, war in der gesamten periläsionalen Zone (Kortex – und CC – Region) homogen verteilt und exprimierte typische gliale Marker. Der andere Zelltyp war charakterisiert durch eine polare Morphologie mit einem oder zwei Fortsätzen (**Abb. 9**). Es konnte weder in diesen Polarzellen noch in den Sternzellen über den gesamten Experimentierzeitraum eine Co – Markierung mit NeuN, einem Marker für ausgereifte Neurone, nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit Voruntersuchungen fanden wir zusammenfassend keinen Hinweis, dass sich die untersuchten DCX^+ – Zellen in der Infarktumgebung im Beobachtungszeitraum zu Neuronen differenzieren (Mullen et al. 1992, Magavi et al. 2000). Die weiteren Untersuchungen mit zusätzlichen Zellmarkern bewiesen jedoch, dass die DCX^+ – Zellen mit sternförmiger Morphologie glialer Natur sind.

Doublecortin wird in der Biologie neuronaler Stammzellen als ein zuverlässiger Marker für unreife Neurone und die Neurogenese angesehen (Jin et al. 2003, Couillard-Despres et al. 2005, Couillard-Despres et al. 2006, Zhao et al. 2008). Besonders unter pathologischen Umständen wurde 2010 durch Jin et al. gezeigt, dass die präläsionale Deletion von DCX^+ – Zellen der SVZ in einem transgenen Mausmodell mit einem deutlich schlechteren Outcome im Vergleich zu Tieren mit funktionstüchtigen DCX^+ – Zellen führt (Jin et al. 2010). Hierbei wurden in transgenen Mäusen 14 Tage vor Setzung des ischämischen Reizes die DCX exprimierenden Zellen sowie die $BrdU^+$ – Zellen dezimiert. Resultierend hieraus waren im Vergleich zu den Kontrolltieren die Infarktvolumina und die funktionellen Defizite signifikant größer. Grund hierfür war offensichtlich eine Störung der Oligodendrogenese, denn Menn et al. zeigte 2006 wie nach Auslösung einer Demyelinisierung durch die Injektion von Lysolecithin in das Corpus Callosum von Mäusen bei in-vitro-Studien aus den DCX^+ – Typ B Zellen der Subventrikularzone migrationsfähige Oligodendrozyten und aus diesen anschließend unreife $NG2^+$ – Zellen, die sich ihrerseits wiederum zu myelinisierenden Zellen entwickeln können, hervorgehen. Dadurch kam es im Verlauf zu einer Remyelinisierung und damit zur Regeneration im Corpus Callosum (Menn et al. 2006).

Unsere Daten hingegen zeigen, dass das Protein Doublecortin nicht ausschließlich von Nervenzellen, sondern im Zusammenhang mit der Erholung in der äußeren periläsionalen Zone von kortikalen Infarkten überwiegend von Gliazellen exprimiert wird. Auch andere Autoren haben in früheren Studien eine DCX – Expression in Gliazellen beobachtet. Zum Beispiel beschrieb Nacher et al. DCX⁺ – Zellen im Hirngewebe, welche die Morphologie von Astrozyten aufwiesen (Nacher et al. 2001). Zusätzlich berichtete Verwer et al. über DCX⁺ – Astrozyten im Neokortex von obduziertem humanem Hirngewebe. Deren Daten zeigten auf, dass differenzierte Astrozyten in einem durch unterschiedliche Erkrankungen betroffenen menschlichen Neokortex Doublecortinkonzentrationen um die Nachweisgrenze aufweisen können (Verwer et al. 2007). Weiterhin analysierte Bloch et al. 2011 das Expressionsmuster von Doublecortin und die Kolo-kalisation mit unterschiedlichen Zellmarkern in der Hirnrinde von Primaten und Menschen. Sie fanden eine signifikante Anzahl von in der Rinde lokalisierten Doublecortin exprimierenden Zellen, wobei 26 % davon ebenfalls GFAP exprimierten (Bloch et al. 2011). Trotzdem verbleibt die Bedeutung der glialen DCX – Expression spekulativ. Verwer et al. vermuten einen Zusammenhang bei der Kommunikation zwischen Gliazellen und Neuronen. Denkbar wäre ebenfalls eine Funktion des Doublecortins bei der durch Insulte ausgelösten Astrozytenmigration. Diese Migration kann im Rahmen der protektiven Aufgaben wie zum Beispiel dem Schutz des gesunden Hirngewebes vor im erkrankten Gewebe stattfindenden Abbauprozessen und später als Barriere der axonalen Regeneration erfolgen (Ridet et al. 1997, Bush et al. 1999). Alternativ könnte die Expression von Doublecortin eine Transdifferenzierung von Astrozyten zu einem mehr plastischen, „stammzellähnlichen“ Phänotyp indizieren. Unsere vorangegangenen Ergebnisse demonstrieren, dass die auf einen Schlaganfall folgende Genesung mit der Expression von Doublecortin in der periläsionalen Zone korreliert (Jin et al. 2010) und dies wiederum auf eine entscheidende Rolle des Doublecortins auf die Reorganisation des ischämischen Gehirns schließen lässt. Nichts desto trotz sind zukünftige Studien notwendig, welche sich weiter mit diesen Fragen befassen.

Als Limitation unserer Studie kann die fehlende Färbung der Sternzellen mit Vimentin und Nestin angesehen werden. Vimentin und Nestin gehören zu den vor allem im Zytoplasma gelegenen Intermediärfilamenten, welche spezifisch für Zelltypen in weitere Untergruppen unterteilt werden. Vimentin gehört zu der

Untergruppe der Desmine und wird in Gliazellen, Astrozyten, Muskelzellen, Zellen mesenchymaler Herkunft und in peripheren Neuronen exprimiert. Teilweise ist Vimentin auch im Nucleolus zu detektieren. Nestin ist ein Neurofilament und wird von neuroepithelialen Zellen exprimiert. Encinas et al. untersuchte 2011 das Schicksal von Zellen während des Alterungsprozesses in der Subgranularzone des Hippocampus. Dort zeigten neuronale Stamm- und Vorläuferzellen eine Vimentin – Expression und ruhende neuronale Vorläuferzellen eine Nestin – Expression. Es wurden zwei Stammzellpopulationen beschrieben, von denen eine radial-glia-ähnliche Charakteristika aufwies und diese Zellen zusätzlich zu den von uns ebenfalls gezeigten Koexpressionen von BrdU und GFAP auch Vimentin und Nestin positiv waren (Encinas et al. 2011).

Der DCX⁺ – Zelltyp mit einer klaren polaren Ausrichtung wurde fast ausschließlich in der CC – Region nahe der subventrikulären Zone nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Sternzellen exprimierten die DCX⁺ – Polarzellen keinerlei gliale Proteine oder andere Marker, welche in der aktuellen Studie analysiert wurden (**Tabelle 3**, Ergebnisse). Der Einsatz der Marker Vimentin/Nestin hätte, wie auch bei den Sternzellen, zu einer genaueren Charakterisierung der DCX⁺ – Polarzellen beitragen und ihre Einordnung als Vorläuferzellen bestärken können. Das hellere Fluoreszieren der DCX⁺ – Polarzellen in den Immunfluoreszenzfärbungen weist auf eine höhere Expression von Doublecortin im Vergleich zu den Sternzellen hin. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass diese Zellen wandernde Vorläuferzellen sind, was mit den Ergebnissen früherer Studien konform geht (Walker et al. 2007). Die Morphologie und Lokalisation der polaren DCX⁺ – Zellen deuten eine Vorläuferzellmigration weg von der subventrikulären Zone an. Leider war es uns nicht möglich die Migration der Polarzellen ausgehend von der subventrikulären Zone zur Läsion hin direkt zu beweisen, da wir keine Experimente hinsichtlich der Migrationsverfolgung durchgeführt haben.

Eine weitere Möglichkeit, weshalb die von uns gewählten Immunfluoreszenzmarker keinen umfassenden Erkenntnisgewinn hinsichtlich der Polarzellen erbrachten, besteht auch in der Annahme, dass der Beobachtungszeitraum (max. vier Wochen postischämisch) zu kurz gewählt war, die Zellen von der Entwicklung noch zu unreif und die Signale zur Entdifferenzierung noch nicht vorhanden waren (Mullen et al. 1992). Rehabilitative Ansätze, wie zum

Beispiel eine reizreiche Umgebung oder Injektionen von stimulierenden Medikamenten könnten zusätzlich möglicherweise einen Effekt auf das Schicksal der beobachteten Zellen haben. Denn 2010 beschrieb Kreuzberg et al. ebenfalls in der Subventrikularzone befindliche Neuroblasten, welche nach einer Okklusion der Arteria cerebri media bereits 14 Tage später in Richtung kortikalem Defekt migrierten (Kreuzberg et al. 2010). Die von Kreuzberg et al. beschriebenen Zellen in der Subventrikularzone sind Morphologisch identisch mit unseren Polarzellen.

Letztlich berichteten einige Autoren über eine Koexpression der DCX⁺ – Zellen im Kortex mit Chondroitin Sulfat Proteoglykan (NG2) (Tamura et al. 2007). NG2 – Zellen machen den Großteil der proliferativen Zellpopulation des adulten Gehirns aus. Sie werden hauptsächlich als Vorläuferzellen der Oligodendrozyten bewertet. Dabei gibt es laufende Debatten darüber, ob unter gewissen Bedingungen NG2⁺ – Zellen Eigenschaften von multipotenten Vorläuferzellen widerspiegeln, um dann zu Neuronen zu differenzieren (Mangin und Gallo 2011, Dimou und Gotz 2014). Unsere Studien beinhalten nicht die kombinierte Markierung von DCX und NG2, was als gewisse Limitation unserer Studie angesehen werden kann. Unser Focus lag jedoch vielmehr auf der Analyse der Koexpression von DCX⁺ – Zellen mit anderen glialen Markern als auf die der Oligodendrogenese.

Eine elektrophysiologische Analyse der Zellen in der SVZ mit anschließender immunhistochemischer Korrelation (Lai et al. 2010) geht mit der Zelleinteilung der bereits erwähnten Studie von Doetsch et al. 1997 konform (Doetsch et al. 1997). Es wurden 5 Zelltypen (Typ 1 – Typ 5) mit unterschiedlichem elektrophysiologischen Verhalten detektiert und diese mit den von Doetsch et al. beschriebenen Zellen korreliert. Man kam zu dem Ergebnis, dass Typ 4 – und Typ 5 – Zellen Astrozyten entsprechen, also Typ B1 und B2 nach Doetsch et al., diese dann zu Typ 1 – Zellen (neuronale Vorläuferzellen / Typ C – Zellen) werden, welche dann wiederum in früh (Typ 2 – Zellen / Typ A – Zellen) und spät differenzierende (Typ 3 – Zellen) Neurone übergehen. Bezieht man diese Ergebnisse auf unsere analysierten Zellpopulationen, kann man festhalten, dass die DCX⁺ – Sternzellen den Typ 4 und Typ 5 – Zellen (Typ B1 und B2 – Zellen) und die DCX⁺ – Polarzellen sowohl den Typ 2 – Zellen als auch den Typ 3 – Zellen entsprechen können. Es ist also möglich, dass unsere Sternzellen nicht nur durch den Infarkt reaktivierte, residierende Astrozyten sind, sondern sie

auch als potentielle neuronale Vorläuferzellen für Neuroblasten betrachtet werden könnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Studie eine weiterführende Charakterisierung der DCX⁺ – Zellpopulationen in der periläsionalen Zone von ischämischen Infarkten bei Mäusen erbracht hat. Die Sichtweise, dass DCX ein spezifischer Marker für neuronale Zelllinien außerhalb von Regionen der Neurogenese im verletzten Gehirn ist, kann von uns nicht eindeutig belegt werden. Doch unsere Daten weisen ebenfalls darauf hin, dass DCX eine entscheidende Bedeutung für die lokale Erholung in der kortikalen Infarktzone hat. Weiterführende Studien sind erforderlich, um die spezifische funktionelle Rolle der durch Ischämie hervorgebrachten DCX⁺ – Zellen weiter aufzuklären.

7. Schlussfolgerung

Nach photothrombotisch induzierten Schlaganfällen im sensomotorischen Kortex ohne den Einsatz neurogenesemodulierender Stimuli, wie reizreiche Umgebung, sensomotorischem Training oder förderlicher Substanzen, können zwei eindeutig unterschiedliche Doublecortin exprimierende Zellpopulationen detektiert werden. Die Sternzellen sind sowohl im Kortex als auch in der CC – Region zahlreich vertreten und zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum von vier Wochen eine signifikante Proliferationsfähigkeit gegenüber der kontralateralen Seite. Die zweite Zellpopulation, die Polarzellen, konnte lediglich in der CC – Region detektiert werden. Die Signalintensität von DCX in den Polarzellen überstieg die der Sternzellen bei Weitem. Die Polarzellen zeigten weiterhin eine Migrationstendenz weg vom RMS in Richtung der kortikalen Läsion, weshalb sie vereinzelt ebenfalls in den tieferen Kortexschichten detektiert werden konnten. Obwohl unsere Arbeitsgruppe in der Vergangenheit zeigen konnte, dass die auf einen Schlaganfall folgende Genesung mit der Expression von Doublecortin in der periläsionalen Zone korreliert (Kunze et al. 2006), exprimierten weder die Sternzellen noch die Polarzellen neuronale Marker. Die einzige nachweisbare Ko – Expression der Sternzellen mit GFAP und S 100 β lässt den Schluss zu, dass diese Zellen glialen Ursprungs sind. In Kongruenz mit anderen Studien kann die Vermutung angestellt werden, dass die DCX⁺ – Sternzellen unter anderem Astrozyten entsprechen, die im Rahmen der postischämischen Abbauprozesse zur Läsion hin wandern und lediglich eine gliale Narbe bilden (Ridet et al. 1997, Bush et al. 1999). Da DCX aber auch als Marker neuronaler Vorläuferzellen anerkannt ist, könnten diese aktivierten Astrozyten sich im Verlauf auch weiterhin zu „stammzellähnlicheren“ Zellen differenzieren und viel später erst positiv für neuronale Marker werden.

Das stärkere DCX – Signal der Polarzellen lässt auf eine höhere Migrationsfähigkeit als die der Sternzellen schließen und könnte ebenfalls aufgrund eines zu kurzen Beobachtungszeitraumes nur teilerfasst sein. Eine Studie über einen längeren Beobachtungszeitraum sowie eine virale DNA – Fluoreszenz – Markierung der Polarzellen über den Seitenventrikel zur Untermauerung unserer Vermutung der Abwanderung der Polarzellen vom RMS in Richtung kortikaler Läsion wäre in Betracht zu ziehen. Es könnte aber auch sein, dass die fehlenden Stimuli, wie Training oder neurogenesestimulierende Substanzen, keinen weiteren

Informationsgewinn über die Herkunft und Entwicklung der kortikalen Zellen zu lassen.

8. Literatur – und Quellenverzeichnis

- Alonso M, Ortega-Perez I, Grubb MS, Bourgeois JP, Charneau P, Lledo PM. 2008. Turning astrocytes from the rostral migratory stream into neurons: a role for the olfactory sensory organ. *J Neurosci*, 28 (43):11089-11102.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. 2002. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*, 8 (9):963-970.
- Bloch J, Kaeser M, Sadeghi Y, Rouiller EM, Redmond DE, Jr., Brunet JF. 2011. Doublecortin-positive cells in the adult primate cerebral cortex and possible role in brain plasticity and development. *J Comp Neurol*, 519 (4):775-789.
- Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*, 467 (1):1-10.
- Burgess HA, Reiner O. 2000. Doublecortin-like kinase is associated with microtubules in neuronal growth cones. *Mol Cell Neurosci*, 16 (5):529-541.
- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. 1999. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*, 23 (2):297-308.
- Cayre M, Canoll P, Goldman JE. 2009. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol*, 88 (1):41-63.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L. 2005. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 21 (1):1-14.
- Couillard-Despres S, Winner B, Karl C, Lindemann G, Schmid P, Aigner R, Laemke J, Bogdahn U, Winkler J, Bischofberger J, Aigner L. 2006. Targeted transgene expression in neuronal precursors: watching young neurons in the old brain. *Eur J Neurosci*, 24 (6):1535-1545.
- Dimou L, Gotz M. 2014. Glial cells as progenitors and stem cells: new roles in the healthy and diseased brain. *Physiol Rev*, 94 (3):709-737.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*, 17 (13):5046-5061.
- Encinas JM, Michurina TV, Peunova N, Park JH, Tordo J, Peterson DA, Fishell G, Koulakov A, Enikolopov G. 2011. Division-coupled astrocytic differentiation

- and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 8 (5):566-579.
- Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J. 1999. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 23 (2):247-256.
- Friocourt G, Koulakoff A, Chafey P, Boucher D, Fauchereau F, Chelly J, Francis F. 2003. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb Cortex*, 13 (6):620-626.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. 1999. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, 23 (2):257-271.
- Hosseini SM, Farahmandnia M, Razi Z, Delavarifar S, Shakibajahromi B. 2015. 12 hours after cerebral ischemia is the optimal time for bone marrow mesenchymal stem cell transplantation. *Neural Regen Res*, 10 (6):904-908.
- Inacio AR, Ruscher K, Leng L, Bucala R, Deierborg T. 2011. Macrophage migration inhibitory factor promotes cell death and aggravates neurologic deficits after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31 (4):1093-1106.
- Jessberger S, Zhao C, Toni N, Clemenson GD, Jr., Li Y, Gage FH. 2007. Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labeling. *J Neurosci*, 27 (35):9400-9407.
- Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Greenberg DA. 2010. Transgenic ablation of doublecortin-expressing cells suppresses adult neurogenesis and worsens stroke outcome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (17):7993-7998.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Batteur S, Simon RP, Greenberg DA. 2001. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (8):4710-4715.
- Jin K, Sun Y, Xie L, Peel A, Mao XO, Batteur S, Greenberg DA. 2003. Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci*, 24 (1):171-189.
- Keiner S, Witte OW, Redecker C. 2009. Immunocytochemical detection of newly generated neurons in the perilesional area of cortical infarcts after intraventricular application of brain-derived neurotrophic factor. *J Neuropathol Exp Neurol*, 68 (1):83-93.

- Keiner S, Wurm F, Kunze A, Witte OW, Redecker C. 2008. Rehabilitative therapies differentially alter proliferation and survival of glial cell populations in the perilesional zone of cortical infarcts. *Glia*, 56 (5):516-527.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386 (6624):493-495.
- Kerjan G, Gleeson JG. 2007. Genetic mechanisms underlying abnormal neuronal migration in classical lissencephaly. *Trends Genet*, 23 (12):623-630.
- Kernie SG, Erwin TM, Parada LF. 2001. Brain remodeling due to neuronal and astrocytic proliferation after controlled cortical injury in mice. *J Neurosci Res*, 66 (3):317-326.
- Koizumi H, Higginbotham H, Poon T, Tanaka T, Brinkman BC, Gleeson JG. 2006. Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat Neurosci*, 9 (6):779-786.
- Kreuzberg M, Kanov E, Timofeev O, Schwaninger M, Monyer H, Khodosevich K. 2010. Increased subventricular zone-derived cortical neurogenesis after ischemic lesion. *Exp Neurol*, 226 (1):90-99.
- Kunze A, Grass S, Witte OW, Yamaguchi M, Kempermann G, Redecker C. 2006. Proliferative response of distinct hippocampal progenitor cell populations after cortical infarcts in the adult brain. *Neurobiol Dis*, 21 (2):324-332.
- Kunze A, Congreso MR, Hartmann C, Wallraff-Beck A, Huttmann K, Bedner P, Requardt R, Seifert G, Redecker C, Willecke K, Hofmann A, Pfeifer A, Theis M, Steinhauser C. 2009. Connexin expression by radial glia-like cells is required for neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (27):11336-11341.
- Lai B, Mao XO, Xie L, Chang SY, Xiong ZG, Jin K, Greenberg DA. 2010. Electrophysiological properties of subventricular zone cells in adult mouse brain. *Brain Res*, 1340:96-105.
- Liu YW, Curtis MA, Gibbons HM, Mee EW, Bergin PS, Teoh HH, Connor B, Dragunow M, Faull RL. 2008. Doublecortin expression in the normal and epileptic adult human brain. *Eur J Neurosci*, 28 (11):2254-2265.
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. 2000. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*, 405 (6789):951-955.
- Manent JB, Wang Y, Chang Y, Paramasivam M, LoTurco JJ. 2009. Dcx reexpression reduces subcortical band heterotopia and seizure threshold in an animal model of neuronal migration disorder. *Nat Med*, 15 (1):84-90.

-
- Mangin JM, Gallo V. 2011. The curious case of NG2 cells: transient trend or game changer? *ASN Neuro*, 3 (1):e00052.
- Matsuo N, Kawamoto S, Matsubara K, Okubo K. 1998. Cloning and developmental expression of the murine homolog of doublecortin. *Biochem Biophys Res Commun*, 252 (3):571-576.
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A. 2006. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci*, 26 (30):7907-7918.
- Montgomery DL. 1994. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet Pathol*, 31 (2):145-167.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116 (1):201-211.
- Nacher J, Crespo C, McEwen BS. 2001. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur J Neurosci*, 14 (4):629-644.
- Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST. 2006. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci*, 26 (50):13007-13016.
- Ohira K, Furuta T, Hioki H, Nakamura KC, Kuramoto E, Tanaka Y, Funatsu N, Shimizu K, Oishi T, Hayashi M, Miyakawa T, Kaneko T, Nakamura S. 2010. Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. *Nat Neurosci*, 13 (2):173-179.
- Osumi N, Shinohara H, Numayama-Tsuruta K, Maekawa M. 2008. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells*, 26 (7):1663-1672.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. 1997. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 17 (10):3727-3738.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci*, 20 (12):570-577.
- Saaltink DJ, Havik B, Verissimo CS, Lucassen PJ, Vreugdenhil E. 2012. Doublecortin and doublecortin-like are expressed in overlapping and non-overlapping neuronal cell population: implications for neurogenesis. *J Comp Neurol*, 520 (13):2805-2823.
- Schroeter M, Jander S, Stoll G. 2002. Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses. *J Neurosci Methods*, 117 (1):43-49.

- Sharp FR, Liu J, Bernabeu R. 2002. Neurogenesis following brain ischemia. *Brain Res Dev Brain Res*, 134 (1-2):23-30.
- Sirko S, Neitz A, Mittmann T, Horvat-Brocker A, von Holst A, Eysel UT, Faissner A. 2009. Focal laser-lesions activate an endogenous population of neural stem/progenitor cells in the adult visual cortex. *Brain*, 132 (Pt 8):2252-2264.
- Song S, Kong X, Acosta S, Sava V, Borlongan C, Sanchez-Ramos J. 2016. Granulocyte colony-stimulating factor promotes behavioral recovery in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurosci Res*.
- Sun F, Wang X, Mao X, Xie L, Jin K. 2012. Ablation of neurogenesis attenuates recovery of motor function after focal cerebral ischemia in middle-aged mice. *PLoS One*, 7 (10):e46326.
- Takasaki C, Yamasaki M, Uchigashima M, Konno K, Yanagawa Y, Watanabe M. 2010. Cytochemical and cytological properties of perineuronal oligodendrocytes in the mouse cortex. *Eur J Neurosci*, 32 (8):1326-1336.
- Tamura Y, Kataoka Y, Cui Y, Takamori Y, Watanabe Y, Yamada H. 2007. Multi-directional differentiation of doublecortin- and NG2-immunopositive progenitor cells in the adult rat neocortex in vivo. *Eur J Neurosci*, 25 (12):3489-3498.
- Verwer RW, Sluiter AA, Balesar RA, Baayen JC, Noske DP, Dirven CM, Wouda J, van Dam AM, Lucassen PJ, Swaab DF. 2007. Mature astrocytes in the adult human neocortex express the early neuronal marker doublecortin. *Brain*, 130 (Pt 12):3321-3335.
- Vreugdenhil E, Kolk SM, Boekhoorn K, Fitzsimons CP, Schaaf M, Schouten T, Sarabdjitsingh A, Sibug R, Lucassen PJ. 2007. Doublecortin-like, a microtubule-associated protein expressed in radial glia, is crucial for neuronal precursor division and radial process stability. *Eur J Neurosci*, 25 (3):635-648.
- Vukovic J, Borlikova GG, Ruitenberg MJ, Robinson GJ, Sullivan RK, Walker TL, Bartlett PF. 2013. Immature doublecortin-positive hippocampal neurons are important for learning but not for remembering. *J Neurosci*, 33 (15):6603-6613.
- Walker TL, Yasuda T, Adams DJ, Bartlett PF. 2007. The doublecortin-expressing population in the developing and adult brain contains multipotential precursors in addition to neuronal-lineage cells. *J Neurosci*, 27 (14):3734-3742.
- Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. 1985. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*, 17 (5):497-504.
- Weimer JM, Anton ES. 2006. Doubling up on microtubule stabilizers: synergistic functions of doublecortin-like kinase and doublecortin in the developing cerebral cortex. *Neuron*, 49 (1):3-4.

-
- Witter MP, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH, Lohman AH. 1989. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol*, 33 (3):161-253.
- Zhao C, Deng W, Gage FH. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132 (4):645-660.

9. Anhang

9.1. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christoph Redecker für die Überlassung der Bearbeitung des spannenden Themas und Herrn Prof. Dr. med. Otto W. Witte für die Option der Promotion. Dr. med. Albrecht Kunze danke ich für die exzellente wissenschaftliche Anleitung und Unterstützung, sowie u.a. für die Verifizierung der Polarzellenquantifizierung. Mein Dank gilt ferner Julia Karius für ausgezeichnete technische Assistenz, Silke Keiner und Josephine Walter für die geteilte wissenschaftliche Expertise.

9.2. Förderung

Stipendium der Ernst – Abbe – Stiftung Jena (IZKF Projekt).

9.3. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich – Schiller – Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. C. Redecker, Dr. med. Albrecht Kunze,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.